



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

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

NOTICE of CHANGE dated 08/06/2022

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«CMV ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTK015PLD

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

- *Extension of the use of the product in association with «ELITe BeGenius[®]» instrument (REF INT040), Plasma and Whole Blood*
- *Update of PERFORMANCE CHARACTERISTICS:*
 - *Change in Limit of Detection (LoD)*
 - *Change in Linear measuring range*
 - *Addition of Repeatability*
 - *Addition of Reproducibility*
- *Introduction of IC cut-off value*

Composition, use and performance 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



DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBILE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT



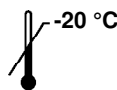
CMV ELITE MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD



0344



ÍNDICE

UTILIZAÇÃO PREVISTA	página 2
PRINCÍPIOS DO ENSAIO	página 2
DESCRIÇÃO DO PRODUTO	página 3
MATERIAIS FORNECIDOS NO KIT	página 3
MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO KIT	página 3
OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS	página 3
AVISOS E PRECAUÇÕES	página 5
ELITE INGENIUS®	página 6
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 6
PROCEDIMENTO DO ELITE INGENIUS®	página 9
ELITE BEGENIUS®	página 18
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 18
PROCEDIMENTO DO ELITE BEGENIUS®	página 19
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DO ELITE INGENIUS® E ELITE BEGENIUS®	página 24
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System	página 38
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 38
PROCEDIMENTO	página 41
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	página 49
Roche cobas z 480 analyzer	página 62
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 62
PROCEDIMENTO	página 63
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	página 69
REFERÊNCIAS	página 74
LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	página 74
RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	página 75
SÍMBOLOS	página 78
NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	página 79

CMV ELITE MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto «CMV ELITE MGB® Kit» é um ensaio qualitativo e quantitativo da amplificação de ácidos nucleicos para a **deteção e quantificação do ADN do Citomegalovírus humano (CMV)** em amostras de ADN extraídas de sangue total colhido em EDTA, plasma colhido em EDTA, líquido cefalorraquidiano (CSF), urina, esfregaço bucal, fluido amniótico e lavagem broncoalveolar (BAL), broncoaspiração (BA).

O produto destina-se para utilização no diagnóstico e monitorização de infeções de CMV, junto com dados clínicos do doente e outros resultados de testes de laboratório.

PRINCÍPIOS DO ENSAIO

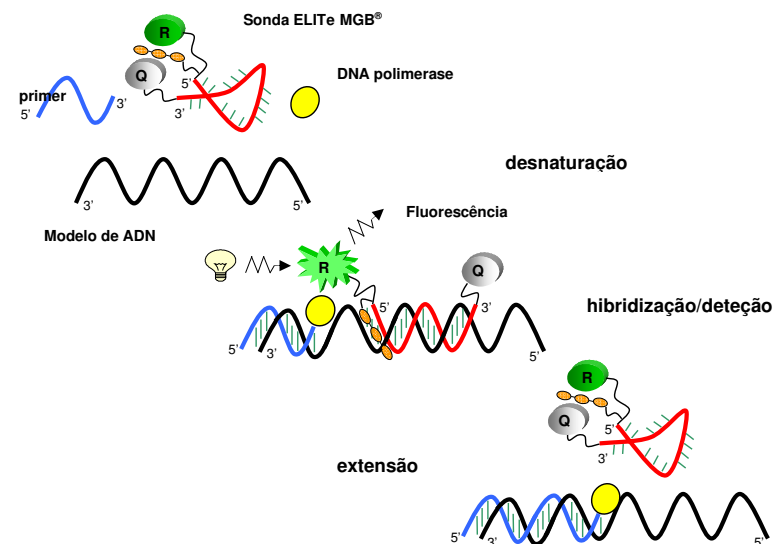
O ensaio consiste numa reação de amplificação em tempo real com um termóstato programável fornecido com um sistema ótico de deteção de fluorescência.

Em cada furo, são realizadas duas reações de amplificação a partir do ADN extraído das amostras a serem testadas: uma reação específica para a **região 4 exon do gene CMV MIEA** (importante antigénico precoce imediato, HCMVUL123) e uma reação específica para a região do **gene beta Globin humano** (Controlo Interno da inibição). A sonda específica do CMV com tecnologia ELITE MGB®, etiquetada com fluoróforo FAM, é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação do CMV. A sonda específica do controlo interno com tecnologia ELITE MGB®, etiquetada com fluoróforo AP525 (semelhante a VICI), é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação do Controlo Interno. À medida que o produto específico da reação de amplificação aumenta, a emissão de fluorescência aumenta e é medida e registada pelo instrumento. O processamento dos dados permite detetar a presença e o título do ADN de CMV na amostra inicial.

No final da sessão de amplificação, pode ser realizada a análise da curva de dissociação (curva de fusão) para determinar a temperatura de dissociação (temperatura de fusão) e para confirmar a presença do alvo correto ou para identificar a presença de mutações.

O ensaio é validado com os sistemas descrito neste manual do utilizador.

Na imagem seguinte é sinteticamente 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, pelo que pode ser usada para a análise da curva de dissociação.



CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto «**CMV ELITE MGB® Kit**» fornece a mistura completa **pronta a usar** "CMV Q - PCR Mix" para amplificação em tempo real numa solução de estabilização, **aliquotada em quatro tubos de teste descartáveis**. Cada tubo contém **540 µL** de solução, suficiente para **24 testes** (processamento pelo menos 2 amostras por sessão) em associação com os sistemas «**ELITE InGenius®**» e «**ELITE BeGenius®**», e **25 testes** em associação com outros sistemas.

Os primários e a sonda específica do CMV (estabilizado pelo grupo MGB®, etiquetado por fluoróforo FAM e extinto por uma molécula não fluorescente) são específicos para a **região exon 4 do gene CMV MIEA** (importante antigénico precoce imediato, HCMVUL123).

Os primários e a sonda para o Controlo Interno (estabilizado com o grupo MGB®, etiquetado por fluoróforo AP525, semelhante ao VIC, e extinto por uma molécula não fluorescente) são específicos do **promotor e da região 5' UTR** do gene **beta Globin** humano.

A mistura de reação fornece tampão, cloreto de magnésio, trifosfatos nucleótidos, fluoróforo AP593, usado em vez de ROX ou Cy5 como referência passiva para normalização da fluorescência, a enzima Uracil-N-glicosidase (UNG) para inativar a contaminação pelo produto de amplificação, a enzima de polimerase de ADN de "arranque a quente".

O produto é suficiente para **96 testes em associação com os sistemas «ELITE InGenius®»** e o «**ELITE BeGenius®**» incluindo normas e comandos.

O produto é suficiente para **100 testes em associação com outros sistemas**, incluindo normas e comandos.

MATERIAIS FORNECIDOS NO KIT

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
CMV Q – PCR Mix	Mistura de reação completa	4 x 540 µL	-

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO KIT

- Câmara de fluxo laminar.
- Luvas de nitrilo sem pó 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 (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Água de grau de biologia molecular.
- Termóstato programável com sistema ótico de deteção de fluorescência 7300 Real Time PCR System ou 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument calibrado de acordo com as instruções do fabricante.
- Termóstato programável com sistema ótico de deteção de fluorescência, analisador cobas z 480, calibrado de acordo com as instruções do fabricante.

OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

Os reagentes para a extração de ADN de amostras, o controlo positivo da extração, o controlo positivo da amplificação, as normas de ADN de quantidade conhecida e os consumíveis **não estão** incluídos neste kit.

Para a extração de ADN manual das amostras a serem analisadas, é validada a utilização do produto genérico «**EXTRAblood**» (ELITechGroup S.p.A., ref. EXTB01), kit para a extração de ADN de amostras celulares e não celulares.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

Para a análise automática da amostra com o instrumento «**ELITE InGenius**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) são necessários os seguintes produtos genéricos: os cartuchos de extração «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200) ou «**ELITE InGenius® SP 1000**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT033SP1000), os consumíveis para extração e amplificação de ácidos nucleicos de amostras biológicas.

«**Conjunto de consumíveis ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT032CS), «**Caixa de desperdícios ELITE InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A, ref. F2102-000), «**Cassete PCR ELITE InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT035PCR) e «**Ponta de filtro Axygen de 300 µL**» (Axygen BioScience Inc., CA, EUA, ref. TF-350-L-R-S).

Para a extração de ADN automática, a amplificação e a interpretação da análise da amostra, é necessário o instrumento «**ELITE InGenius**» (**ELITechGroup S.p.A., ref. INT030**) e os seguintes Protocolos de ensaio específicos (ELITechGroup S.p.A):

para os calibradores «**CMV ELITE STD**» ou «**CMV ELITE STD_1000_100**»,
para o controlo positivo da amplificação «**CMV ELITE PC**» ou «**CMV ELITE PC_1000_100**»,
para o controlo negativo da amplificação «**CMV ELITE NC**» ou «**CMV ELITE NC_1000_100**»,
para a análise de amostras «**CMV ELITE WB_200_100**», «**CMV ELITE PL_200_100**», «**CMV ELITE PL_1000_100**», «**CMV ELITE CSF_200_100**», «**CMV ELITE U_200_100**», «**CMV ELITE BS_200_100**», «**CMV ELITE AF_200_100**» e «**CMV ELITE BAL_200_100**».

Para uma análise automática da amostra com o instrumento «**ELITE BeGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT040) está validada a utilização do produto genérico: os cartuchos de extração «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200), os consumíveis para extração e amplificação de ácidos nucleicos a partir de amostras biológicas «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT032CS), «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A, ref. F2102-000), «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT035PCR) e «**1000 µL Filter Tips Tecan**» (Tecan, Switzerland, ref. 30180118).

Para a extração de ADN automática, a amplificação e a interpretação da análise da amostra, é necessário o instrumento «**ELITE BeGenius**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT040) e os seguintes Protocolos de ensaio específicos (ELITechGroup S.p.A):

para os calibradores «**CMV ELITE Be STD**»,
para o Positive Control da amplificação «**CMV ELITE Be PC**»,
para o Negative Control da amplificação «**CMV ELITE Be NC**»,
para análise das amostras «**CMV ELITE Be WB_200_100**» e «**CMV ELITE Be PL_200_100**».

Para extração de ADN automática das amostras a serem analisadas, é válida a utilização do produto genérico «**ELITE STAR 200 Extraction kit**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT011EX), kit para extração de ácido nucleico de amostras biológicas, com o instrumento «**ELITE STAR**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT010).

Para extração de ADN automática e preparação de microplacas para amplificação de amostras a serem analisadas, é validada a utilização do produto genérico «**ELITE GALAXY 300 Extraction Kit**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT021EX), kit para extração de ácido nucleico de amostras biológicas com o instrumento «**ELITE GALAXY**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT020).

Para extração de ADN automática de amostras a serem analisadas, também são validados os produtos genéricos «**NucliSENS® easyMAG® Reagents**» (bioMérieux SA, ref. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), kits para extração de ácido nucleico de amostras biológicas, com o instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**» (bioMérieux SA, ref. 200111).

Para extração de ADN automática de amostras a serem analisadas, também são validados os produtos «**Mini kit de ADN QIASymphony®**» (QIAGEN GmbH, ref. 931236) e «**Kit médio de Vírus DSP/Patogénio QIASymphony®**» (QIAGEN GmbH, ref. 937055), kits para extração de ácido nucleico de amostras biológicas, com o instrumento «**QIASymphony® SP/AS**» (QIAGEN GmbH, ref. 9001297, 9001301) e produtos genéricos afins.

Para extração de ADN automática das amostras a serem analisadas, o produto «**MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit**» (Roche, ref. 07658036001), kit para extração de ácido nucleico de amostras biológicas, com o instrumento «**MagNA Pure 24 System**» (Roche, ref. 07290519001) também está validado.

CMV ELiTe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

Quando for usado um Sistema de PCR em tempo real 7300, é recomendado usar o produto genérico «**Q - PCR Microplates**» (ELITechGroup S.p.A., ref. RTSACC01), microplacas com furos de 0,2 mL e folhas vedantes adesivas para amplificação em tempo real.

Quando for usado um 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, é necessário o uso do produto genérico: «**Q - PCR Microplates Fast**» (ELITechGroup S.p.A., ref. RTSACC02), microplacas com furos de 0,1 mL e folhas vedantes adesivas para amplificação em tempo real.

Quando for usado um cobas z 480 analyzer, é necessário usar o produto genérico «**AD-plate 0.3ml**» (Roche, ref. 05232724001), microplacas com furos de 0,3 mL e folhas vedantes adesivas para amplificação em tempo real.

Se for necessária a detecção de ADN de CMV (análise qualitativa), use o produto «**CMV - ELiTe Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR015PLD) ou o produto «**CMV - ELiTe Positive Control RF**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR015PLD-R), positive control de ADN de plasmídeo.

Se for necessária a detecção e quantificação de ADN de CMV (análise quantitativa), use o produto «**CMV ELiTe Standard**» (ELITechGroup S.p.A., ref. STD015PLD), quatro diluições de ADN de plasmídeo de quantidade conhecida para obter a curva standard.

Como controlo positivo da extração de ácidos nucleicos a partir de amostras não celulares e controlo da inibição, é necessário o uso do produto genérico «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTRCPE), uma solução estabilizada que contém dois ADNs de plasmídeo e o ARN genómico do fago MS2.

Um fator de conversão permite exprimir os resultados da análise quantitativa em Unidades Internacionais do CMV da "1.^a Norma Internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/162, Reino Unido).

AVISOS E PRECAUÇÕES

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

Avisos e precauções gerais

Manuseie e elimine todas as amostras biológicas como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite o contacto direto com as amostras biológicas. Evite salpicos ou vaporizações. Os materiais que entrarem em contacto com as amostras biológicas devem ser tratados durante, pelo menos, 30 minutos com 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 bases devem ser neutralizados antes da eliminação.

- Use vestuário e luvas de proteção adequados e proteja os olhos e o rosto.
- Nunca deve pipetar soluções com a boca.
- Não coma, beba, fume ou aplique produtos cosméticos nas áreas de trabalho.
- Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.
- Elimine os reagentes remanescentes e os desperdícios em conformidade com os regulamentos em vigor.
- Leia atentamente todas as instruções fornecidas no produto antes de efetuar o ensaio.
- Durante a realização do ensaio, siga as instruções fornecidas no produto.
- Não utilize o produto após a data de validade indicada.
- Use apenas os reagentes fornecidos no produto e os recomendados pelo fabricante.
- Não use reagentes de lotes diferentes.
- Não use reagentes de outros fabricantes.

Avisos e precauções para biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular, como a extração, amplificação e detecção de ácidos nucleicos, 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.

Quando a sessão de amplificação for configurada manualmente, é necessário ter disponíveis áreas

CMV ELiTe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação. Nunca introduza um produto de amplificação na área designada para a extração/preparação de reações de amplificação.

Quando a sessão de amplificação for configurada manualmente, é necessário ter disponíveis batas, luvas e ferramentas de laboratório que sejam exclusivamente usadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação. Nunca transfira batas, luvas ou ferramentas de laboratório da área designada para a amplificação/deteção de produtos de amplificação para a área designada para a extração/preparação de reações de amplificação.

As amostras devem ser usadas exclusivamente para este tipo de análise. As amostras devem ser manuseadas sob uma câmara de fluxo laminar. Os tubos contendo amostras diferentes nunca devem ser abertos ao mesmo tempo. As pipetas usadas no manuseamento de amostras devem ser usadas exclusivamente para este fim específico. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

Os reagentes devem ser manuseados sob uma câmara de fluxo laminar. Os reagentes necessários para a 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.

Os produtos de extração devem ser manuseados de modo a reduzir, tanto quanto possível, a dispersão para o ambiente, para evitar a possibilidade de contaminação. As pipetas usadas no manuseamento de produtos de extração devem ser usadas exclusivamente para este fim.

Os produtos de amplificação devem ser manuseados de modo a reduzir, tanto quanto possível, a dispersão para o ambiente, para evitar a possibilidade de contaminação. As pipetas usadas no manuseamento de produtos de amplificação devem ser usadas exclusivamente para este fim.

Avisos e precauções específicos para os componentes

A **Mistura CMV Q - PCR** deve ser guardada a -20 °C num local escuro.

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

A **CMV Q - PCR Mix** pode ser utilizada para 5 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada.

ELiTe InGenius®

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser utilizado com as seguintes amostras clínicas:

Sangue total colhido em EDTA

As amostras de sangue total para extração de ácido nucleico devem ser colhidas em EDTA e identificadas de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas a +2°/+8 °C e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de três dias, caso contrário, devem ser congeladas e guardadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

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: quando a extração de ácido nucleico do sangue total for realizada com o **ELiTe InGenius** e com o **software ELiTe InGenius®** versão 1.3 (ou versões equivalentes mais recentes), use os protocolos de extração **CMV ELiTe_WB_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o controlo interno de **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL da água.

Quando for usado o tubo principal, o volume das amostras varia de acordo com o tipo de tubo carregado. Consulte as instruções de utilização do kit de extração para obter mais informações sobre como preparar e realizar o procedimento de extração.

CMV ELiTe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

Plasma colhido em EDTA

As amostras de plasma para extração de ácido nucleico devem ser colhidas em EDTA de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas a +2°/+8 °C e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de três dias, caso contrário, devem ser congeladas e guardadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

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

Nota: quando a extração de ADN de 200 µL de plasma for realizada com o **ELiTe InGenius** e com o **Software ELiTe InGenius** versão 1.3 (ou versões equivalentes mais recentes), use os protocolos de extração **CMV ELiTe_PL_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o controlo interno **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL da água.

Nota: quando a extração de ácido nucleico de 1000 µL de plasma for realizada com o **ELiTe InGenius** e com o **software ELiTe InGenius** versão 1.3 (ou versões equivalentes mais recentes), use os protocolos de extração **CMV ELiTe_PL_1000_100**. Este protocolo processa 1000 µL de amostra, adiciona o **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

O tubo primário não pode ser usado em associação com o protocolo de ensaio **CMV ELiTe_PL_1000_100**.

Líquido cefalorraquidiano (LCR)

As amostras de líquido cefalorraquidiano (CSF) para extração de ácido nucleico devem ser colhidas de acordo com as diretrizes laboratoriais evitando a contaminação pelo sangue do doente, transportadas a +2°/+8 °C e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de quatro horas, caso contrário, devem ser congeladas e guardadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

Antes da análise com este produto, devem ser transferidos 0,2 mL da amostra para o Tubo de extração fornecido com o «ELiTe InGenius® SP 200 Consumable Set».

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

Nota: quando a extração de ácido nucleico do líquido cefalorraquidiano for realizada com o **ELiTe InGenius** e com o **software ELiTe InGenius** versão 1.3 (ou versões equivalentes mais recentes), use os protocolos de extração **CMV ELiTe_CSF_200_100**. Este protocolo processa 200 µL de amostra, adiciona o **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Urina

As amostras de urina para extração de ácido nucleico devem ser colhidas em recipientes sem conservantes de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas e guardadas à temperatura ambiente (+18/+25 °C) durante um período máximo de quatro horas, caso contrário, devem ser congeladas e guardadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

Antes da análise com este produto, devem ser transferidos 0,2 mL da amostra para o Tubo de extração fornecido com o «ELiTe InGenius® SP 200 Consumable Set».

Se possível, evite congelar amostras de primeira urina. A congelamento pode causar a precipitação de inibidores e a perda de título de ADN.

Recomenda-se a separação das amostras a serem congeladas em alíquotas para evitar ciclos repetidos de congelamento e descongelamento.

Nota: quando a extração de ADN de urina for realizada com o **ELiTe InGenius** e com o **Software ELiTe InGenius** versão 1.3 (ou versões equivalentes mais recentes), use os protocolos de extração **CMV ELiTe_U_200_100**. Este protocolo processa 200 µL de amostra, adiciona o **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Esfregaço bucal

As amostras de esfregaço bucal para extração de ácido nucleico devem ser colhidas com os sistemas de recolha e transporte «Kit eSwab Collection» (COPAN Italia S.p.A., ref. 480CE), identificadas de acordo com as diretrizes laboratoriais, bem como transportadas e guardadas à temperatura ambiente (+18/25 °C) durante o máximo de cinco dias ou a +2/+8 °C durante um máximo de sete dias; caso contrário, as amostras deverão ser congeladas e guardadas a -20 °C durante um máximo de seis meses ou a -70 °C durante períodos mais longos.

CMV ELiTe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

Antes da análise com este produto, devem ser transferidos 0,2 mL da amostra para o Tubo de extração fornecido com o «ELiTe InGenius® SP 200 Consumable Set».

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

Nota: quando a extração de ácido nucleico do esfregaço bucal for realizada com o **ELiTe InGenius** e com o **software ELiTe InGenius** versão 1.3 (ou versões equivalentes mais recentes), use os protocolos de extração **CMV ELiTe_BS_200_100**. Este protocolo processa 200 µL de amostra, adiciona o **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Líquido amniótico

As amostras de líquido amniótico para extração de ácido nucleico devem ser colhidas de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas a +2°/+8 °C e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de quatro horas, caso contrário, devem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

Antes da análise com este produto, devem ser transferidos 0,2 mL da amostra para o Tubo de extração fornecido com o «ELiTe InGenius® SP 200 Consumable Set».

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

Nota: quando a extração de ácido nucleico do líquido amniótico for realizada com o **ELiTe InGenius** e com o **software ELiTe InGenius** versão 1.3 (ou versões equivalentes mais recentes), use os protocolos de extração **CMV ELiTe_AF_200_100**. Este protocolo processa 200 µL de amostra, adiciona o **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Lavagem broncoalveolar (BAL) e broncoaspiração (BA)

As amostras de BAL/BA, destinadas à extração de ADN, devem ser colhidas numa solução fisiológica esterilizada ou PBS esterilizada de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas a +2/+8 °C e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de uma semana. Caso contrário, devem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C durante, no máximo, um ano, em conformidade com as práticas laboratoriais.

Antes da análise com este produto, devem ser transferidos 0,2 mL da amostra para o Tubo de extração fornecido com o «ELiTe InGenius® SP 200 Consumable Set».

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

Se as amostras de BAL/BA forem particularmente mucosas, podem ser liquidificadas por reagentes à base de ditiotretol (por ex. Sputasol, Oxoid, Thermo Fisher Scientific) em conformidade com as diretrizes laboratoriais.

Nota: quando a extração de ADN de BAL/BA for realizada com o **ELiTe InGenius** e com o **Software ELiTe InGenius** versão 1.3 (ou versões equivalentes mais recentes), utilize o Protocolo de ensaio **CMV ELiTe_BAL_200_100**. Este protocolo processa 200 µL de amostra, adiciona o **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Outras amostras:

Não existem dados disponíveis relativos aos desempenhos do produto com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: suspensões de leucócitos, suspensões de granulócitos.

Substâncias interferentes

O ADN extraído da amostra não deve conter heparina, hemoglobina, dextran, Ficoll®, etanol ou 2-propanol para evitar problemas de inibição e a possibilidade de resultados inválidos frequentes.

Não existem dados disponíveis relativos a uma inibição causada por fármacos antivirais, antibióticos, quimioterapêuticos ou imunossuppressores.

Calibradores da amplificação e controlos da amplificação

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

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

como definição do calibrador, utilize os quatro níveis de concentração do **CMV ELITE Standard**, em associação com o protocolo «**CMV ELITE STD**» ou «**CMV ELITE STD_1000_100**», como positive control da amplificação use o **CMV - ELITE Positive Control**, em associação com o protocolo «**CMV ELITE_PC**» ou «**CMV ELITE_PC_1000_100**», como negative control da amplificação, use água de qualidade para biologia molecular (não fornecida com este kit) em associação com o protocolo «**CMV ELITE_NC**» ou «**CMV ELITE_NC_1000_100**».

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

As curvas da calibração, aprovadas e guardadas na base de dados, irão expirar após 60 dias. Na data de fim da validade será necessário fazer uma nova execução dos Q-PCR Standards em associação com o lote do reagente de amplificação.

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

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

- for iniciado um novo lote de reagentes de amplificação,
- os resultados da análise de Controlo da qualidade (ver o parágrafo seguinte) se encontrarem fora da especificação,
- for realizada qualquer manutenção significativa no instrumento.

Controlos da qualidade

Os controlos de qualidade externos devem ser usados em conformidade com as organizações de acreditação locais, estatais e federais, consoante aplicável. Os controlos de qualidade externos estão disponíveis no mercado.

PROCEDIMENTO DO ELITE InGenius®

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

- verificação da prontidão do sistema
- preparação da sessão
- revisão e aprovação de resultados

Verificação da prontidão do sistema

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

- ligar o **ELITE InGenius** e selecionar o modo «**CLOSED**» (Fechado);
- verificar se os Calibradores (**CMV Q-PCR Standard**) foram executados, aprovados e não estão expirados (estado). Pode verificar esta situação no menu «Calibração» na página inicial;
- verifique (Controlos) se os controlos da amplificação (**CMV Positive Control**, **CMV Negative Control**) foram executados, aprovados e não estão expirados (estado). Pode verificar esta situação no menu «Controlo» na página inicial;
- escolher o tipo de execução e preparar a mesma, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pelo ELITechGroup. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os kits ELITE MGB®, matrizes e o instrumento ELITE InGenius.

Os Protocolos de ensaio disponíveis para o «**CMV ELITE MGB® Kit**» estão descritos na tabela seguinte.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

Protocolos de ensaio para o CMV ELITE MGB® kit			
Nome	Matriz	Unidade do relatório	Características
CMV ELITE_WB_200_100	Sangue Total	gEq/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo Interno: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
CMV ELITE_PL_200_100	Plasma	gEq/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo Interno: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
CMV ELITE_PL_1000_100	Plasma	gEq/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 1000 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo Interno: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
CMV ELITE_CSF_200_100	Líquido cefalorraquidiano	gEq/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo Interno: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
CMV ELITE_U_200_100	Urina	gEq/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo Interno: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

Protocolos de ensaio para o CMV ELITE MGB® kit			
Nome	Matriz	Unidade do relatório	Características
CMV ELITE_BS_200_100	Esfregaço bucal	gEq/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo Interno: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
CMV ELITE_AF_200_100	Líquido amniótico	gEq/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo Interno: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
CMV ELITE_BAL_200_100	BAL/BA	gEq/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo Interno: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

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

Os protocolos para análise qualitativa estão disponíveis a pedido.

Preparação da sessão

O CMV ELITE MGB® Kit em associação com o ELITE InGenius pode ser usado para:

- Execução integrada (Extract + PCR) (Extração + PCR),
- Execução de amplificação (PCR Only) (apenas PCR),
- Execução da calibração (PCR Only) (apenas PCR),
- Execução de amplificação para Positive e Negative Control (PCR only) (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 enviar a informação da sessão de trabalho. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

Estão descritas a seguir as operações principais para definir os quatro tipos de deslocação.

A. Execução integrada

Para configurar a execução integrada, execute os passos seguintes de acordo com a **Interface gráfica do utilizador (GUI) do SW**:

- Descongele os tubos da CMV Q - PCR Mix à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos em número suficiente para a sessão. Cada tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo

durante 5 segundos.

Nota: Descongele a CMV Q - PCR Mix num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

- Descongele um número suficiente de tubos CPE para a sessão. Cada tubo é suficiente para 12 extrações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
- Selecione o volume de entrada da extração: 200 µL para processar 200 µL da amostra ou 1000 µL para processar 1000 µL da amostra e certifique-se de que o Volume de eluição extraído é 100 µL.
- Para cada Rastreo de interesse preencha a "SampleID" (SID) digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
- Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (isto é, CMV ELITE_WB_200_100).
- Certifique-se de que o "Protocol" apresentado é: "Extract + PCR" (Extração + PCR).
- Selecione a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position":
 - se for usado um tubo primário, selecione "Primary Tube" (Tubo primário). O Tubo primário apenas pode ser usado a partir de amostras de 200 µL.
 - se for usado um tubo secundário, selecione "Tubo de extração".
 - Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a CPE e a Mistura CMV Q-PCR no "Bloco de inventário" selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a "Cassete PCR", os cartuchos de extração "ELITE InGenius SP 200" ou "ELITE InGenius SP1000", todos os consumíveis necessários e as amostras a serem extraídas nas posições especificadas no passo 8, seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

Nota: A PCR Mix pode ser utilizada para 5 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

B. Execução da amplificação

Para preparar a execução de amplificação efetue os passos a seguir em conformidade com a GUI:

1. Descongele os tubos da CMV Q - PCR Mix à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos em número suficiente para a sessão. Cada tubo é suficiente para 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Descongele a CMV Q - PCR Mix num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

2. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
3. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o Volume de entrada de extração é 200 µL para processar 200 µL da amostra ou 1000 µL para processar 1000 µL da amostra e certifique-se de que o Volume de eluição extraído é 100 µL.
4. Para cada Rastreo de interesse introduza a "SampleID" (SID) digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
5. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (isto é, CMV ELITE_WB_200_100).
6. Selecione "PCR Only" (apenas PCR) na coluna "Protocol".
7. Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Posição da amostra" é "Tubo de eluição (fila inferior)". Clique em "Next" para continuar a preparação.
8. Carregue a Mistura CMV Q-PCR no "Bloco de inventário" selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue a "PCR Cassette" e as amostras de Ácido nucleico extraídas seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
11. Feche a porta do instrumento.
12. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

Nota: A PCR Mix pode ser utilizada para 5 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

C. Execução de calibração

Para preparar a execução de Calibração, efetue os passos a seguir em conformidade com a GUI:

1. Descongele os tubos da CMV Q - PCR Mix à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos em número suficiente para a sessão. Cada tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Descongele a CMV Q - PCR Mix num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

2. Descongele os tubos CMV Q - PCR Standard (Cal1: CMV Q-PCR Standards 10², Cal2: CMV Q-PCR Standards 10³, Cal3: CMV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: CMV Q-PCR Standards 10⁵) à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
4. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Volume de entrada de extração" é 200 µL para processar 200 µL da amostra ou 1000 µL para processar 1000 µL da amostra e certifique-se de que o Volume de eluição extraído é 100 µL.
5. Começando a partir do Rastreo de interesse, selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Ensaio" (CMV ELITE_STD ou CMV ELITE_STD_1000_100) e preencha com o número do lote e a data de expiração para o CMV Q - PCR Standard. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
6. Carregue a Mistura CMV Q-PCR no "Bloco de inventário" selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
7. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
8. Carregue os tubos **CMV Q-PCR Standard** e a "PCR Cassette" no instrumento seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação. Tenha o cuidado de carregar os fluidos PCR Standard nos rastreios corretos como indicado na GUI.
9. Feche a porta do instrumento.
10. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

Nota: A PCR Mix pode ser utilizada para 5 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

D. Execução de amplificação para Controlo Positivo e Controlo Negativo

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

1. Descongele os tubos da CMV Q - PCR Mix à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos para a amplificação do controlo positivo. Cada tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Descongele a CMV Q - PCR Mix num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

2. Descongele CMV - ELITe Positive Control à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos para a amplificação do controlo positivo. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Transfira pelo menos 50 µL da água de qualidade para biologia molecular para as sessões num tubo Eluição, fornecido com o Conjunto de consumíveis ELITe InGenius® SP.
4. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
5. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o Volume de entrada da extração: 200 µL para processar 200 µL da amostra ou 1000 µL para processar 1000 µL da amostra e certifique-se de que o Volume de eluição extraído é 100 µL.
6. Para o controlo positivo, selecione CMV ELITe_PC ou CMV ELITe_PC_1000_100 e preencha o número do lote e a data de validade do Controlo positivo CMV.
7. Para o controlo negativo, selecione CMV ELITe_NC ou CMV ELITe_NC_1000_100 e preencha o número do lote e a data de validade da água de qualidade para biologia molecular.
8. Clique em "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue a Mistura CMV Q-PCR no "Bloco de inventário" selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue a Cassete PCR da amplificação, o tubo de Positive Control de CMV e o tubo de Negative Control seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
12. Feche a porta do instrumento.
13. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

Nota: O Controlo positivo e o Controlo negativo devem ser executados como controlo da amplificação, para preparar os "Gráficos de controlo". São necessários quatro resultados de Controlo positivo e Controlo negativo, de 4 execuções diferentes, para preparar o gráfico de controlo. Após isso, os resultados do Positive Control e Negative Control são usados para monitorização dos desempenhos do passo de amplificação. Consulte o manual do utilizador do instrumento para obter mais informações.

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

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

Nota: A PCR Mix pode ser utilizada para 5 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

Revisão e aprovação de resultados

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

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.

Nota: Para obter informações mais detalhadas, consulte o manual do utilizador do instrumento **ELITe InGenius**.

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

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

A. Validação da Curva de calibração

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda CMV específica ("CMV") nas reações de amplificação do Calibrador são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos no protocolo de ensaio "CMV ELITe_STD" e "CMV ELITe_STD_1000_100".

A Curva de calibração, específica para o lote do reagente de amplificação, é guardada na base de dados (Calibração) após a aprovação do "Administrador" ou "Analista" seguindo as instruções na GUI.

A Curva de calibração, específica para o lote de reagente de amplificação, irá expirar **após 60 dias**.

Antes da análise de qualquer amostra, é absolutamente obrigatório criar e aprovar a Curva de calibração para o lote do reagente de amplificação. A disponibilidade de resultados da Curva de calibração com "Aprovado" (Estado) é mostrada na janela "Calibração" do software ELITe InGenius.

Nota: se a Curva de calibração não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem "Falhou" no ecrã "Calibração" e não é possível aprovar a mesma. Têm de ser repetidas as reações de amplificação do Calibrador.

Nota: se a curva de calibração for executada em conjunto com amostras e o respetivo resultado for inválido, as amostras não são quantificadas e não pode ser aprovada. Neste caso, também deve ser repetida a amplificação de todas as amostras.

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

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda específica CMV ("CMV") na reação de amplificação de Controlo positivo e Controlo negativo são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos no protocolo de ensaio "CMV ELITe_PC", "CMV ELITe_PC_1000_100", "CMV ELITe_NC" e "CMV ELITe_NC_1000_100".

Os resultados da amplificação do Positive Control e Negative Control, 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 "Analyst", seguindo as instruções na GUI.

Os resultados da amplificação de Positive Control e Negative Control, específicos para o lote de reagente de amplificação, irão expirar após 15 dias.

Antes de analisar qualquer amostra, é absolutamente obrigatório certificar-se de que o Controlo positivo e Controlo negativo da amplificação foram executados com o lote do reagente de amplificação a ser usado e que os resultados estão aprovados e válidos. A disponibilidade de resultados do Controlo positivo e Controlo negativo da amplificação "Aprovados" (Estado) é mostrada na janela "Controlos" da GUI. Se os resultados da amplificação de Controlo positivo e Controlo negativo estiverem em falta, crie os mesmos da forma acima descrita.

Os resultados das execuções de amplificação de Controlo positivo e Controlo negativo são usados pelo software do instrumento para calcular a preparação dos "Gráficos de controlo". São necessários quatro resultados de Controlo positivo e Controlo negativo, de quatro execuções diferentes, para preparar o "Gráfico de controlo". Após isso, os resultados do Positive Control e Negative Control são usados para

CMV ELiTe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

monitorização dos desempenhos do passo de amplificação. Consulte o manual do 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 Positive Control ou Negative Control da amplificação.

Nota: Quando o Controlo positivo ou Controlo negativo forem executados como controlo da amplificação em conjunto com amostras e o respetivo resultado for inválido, toda a sessão é inválida e deve ser repetida a amplificação de todas as amostras.

C. Validação dos resultados das amostras

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda CMV específica ("CMV") e pela sonda de Controlo Interno específica ("CI") em cada reação de amplificação da amostra são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos no protocolo de ensaio.

Nota: Antes da análise de qualquer amostra, é absolutamente obrigatório criar e aprovar a Curva de calibração e os Controlos de amplificação para o lote do reagente usado. É recomendado, mas opcional, executar o Positive e Negative Control em conjunto com os Calibradores. A disponibilidade de resultados da Curva de calibração e de positive control e negative control da amplificação com "Approved" (Estado) é mostrada nas janelas "Calibration" e "Controls" do software ELiTe InGenius, sendo comunicada na secção "Assay Parameters" (Parâmetros do ensaio).

Os resultados são descritos nos relatórios gerados pelo instrumento ("Exibição dos resultados").

A execução da Amostra é válida quando forem cumpridas as três condições reportadas na tabela abaixo.

1) Curva de calibração	Estado
CMV Q-PCR Standard	APROVADO
2) Positive Control	Estado
CMV Positive Control	APROVADO
3) Negative Control	Estado
CMV Negative Control	APROVADO

Para cada amostra, o resultado do ensaio é automaticamente interpretado pelo sistema como estabelecido pelo algoritmo **ELiTe InGenius Software** e os parâmetros do Protocolo do ensaio.

O sistema efetua automaticamente o cálculo da carga viral para cada amostra. A medição exprime-se em "gEq/mL" ou "IU/mL", conforme definido no protocolo do ensaio.

Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado de uma Amostra.

Resultado da execução da amostra	Interpretação
CMV: ADN detetado, quantidade igual a XXX gEq/mL ou IU/mL	ADN CMV detetado no intervalo de medição do ensaio, quantidade como mostrado.
CMV: ADN detetado, quantidade inferior a LLoQ gEq/mL ou IU/mL	ADN CMV detetado abaixo do limite inferior de quantificação do ensaio
CMV: ADN detetado, quantidade acima de ULQ gEq/mL ou IU/mL	ADN CMV detetado além do limite superior de quantificação do ensaio
CMV: ADN não detetado ou inferior a LoD gEq/mL ou IU/mL	ADN CMV não detetado ou abaixo do limite de deteção do ensaio.
Inválido - Voltar a testar a amostra	Resultado da amostra não válido devido a falha do Internal Control (Extração incorreta ou transferência do inibidor).

As amostras não adequadas para interpretação dos resultados são reportadas como "Inválido - Voltar a testar a amostra" pelo **ELiTe InGenius Software**. Neste caso, o ADN do controlo interno não foi detetado eficientemente devido a problemas no passo de amplificação ou extração (degradação do ADN, perda de ADN durante a extração ou transferência de inibidores na eluição), que pode resultar em falsos negativos.

Quando o volume da eluição é suficiente, a amostra extraída pode ser novamente testada através de uma execução da amplificação no modo "PCR Only". No caso de um segundo resultado inválido, a

CMV ELiTe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

amostra deve ser novamente testada começando a partir da extração de uma nova alíquota utilizando o modo "Extract + PCR".

As amostras adequadas para análise mas em que não foi possível detetar ADN são reportadas como: "ADN não detetado ou inferior ao LoD". Neste caso, não pode excluir-se que o ADN do gene de resistência está presente 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) pelo "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 "Sample Report" e "Track Report".

D. Elaboração do relatório do resultado das amostras

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

O "Relatório da amostra" apresenta os detalhes de uma execução da amostra ordenada pela ID da amostra (SID).

O "Track Report" apresenta os detalhes de uma execução da amostra, rastreio a rastreio.

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

ELiTe BeGenius®

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser utilizado com as seguintes amostras clínicas:

Sangue total colhido em EDTA

As amostras de sangue total para extração de ácido nucleico devem ser colhidas em EDTA e identificadas de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas a +2/+8 °C e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de três dias, caso contrário, devem ser congeladas e guardadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

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: quando a extração de ADN de sangue total for realizada com o **ELiTe BeGenius®** e o software **ELiTe BeGenius®** versão 2.0.0 (ou versões equivalentes mais recentes), use o protocolo de extração **CMV ELiTe_Be_WB_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o **CPE Internal Control** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Quando for usado o tubo principal, o volume das amostras varia de acordo com o tipo de tubo carregado. Consulte as instruções de utilização do kit de extração para obter mais informações sobre como preparar e realizar o procedimento de extração.

Plasma colhido em EDTA

As amostras de plasma para extração de ácido nucleico devem ser colhidas em EDTA de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas a +2/+8 °C e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de três dias, caso contrário, devem ser congeladas e guardadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

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: quando a extração de ADN a partir de 200 µL de plasma for realizada com o **ELiTe BeGenius®** e o software **ELiTe BeGenius®** versão 2.0.0 (ou versões posteriores equivalentes), utilize o protocolo de extração **CMV ELiTe_Be_PL_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o controlo interno de **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

CMV ELiTe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

Outras amostras:

Não existem dados disponíveis relativos aos desempenhos do produto com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: líquido cefalorraquidiano (LCR), urina, zaragatoa bucal, líquido amniótico, lavagem broncoalveolar (LBA) e aspirado brônquico (AB), suspensões de leucócitos, suspensões de granulócitos.

Substâncias interferentes

O ADN extraído da amostra não deve conter heparina, hemoglobina, dextran, Ficoll®, etanol ou 2-propanol para evitar problemas de inibição e a possibilidade de resultados inválidos frequentes.

Não existem dados disponíveis relativos a uma inibição causada por fármacos antivirais, antibióticos, quimioterapêuticos ou imunossupressores.

Calibradores da amplificação e controlos da amplificação

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

como definição do calibrador, utilize os quatro níveis de concentração do **CMV ELiTe Standard**, em associação com o protocolo «**HSV1 ELiTe_Be_STD**», como controlo positivo da amplificação, use o **CMV - ELiTe Positive Control**, em associação com o protocolo «**CMV ELiTe_Be_PC**», como negative control da amplificação, use água de qualidade de biologia molecular (não fornecida com este kit) em associação com o protocolo «**CMV ELiTe_Be_NC**».

Nota: ELiTe BeGenius com o **software ELiTe BeGenius** requer resultados aprovados e válidos da curva de calibração e dos controlos da amplificação para cada lote de reagente de amplificação guardado na respetiva base de dados.

As curvas da calibração, aprovadas e guardadas na base de dados, irão expirar após 60 dias. Na data de fim da validade será necessário fazer uma nova execução dos Q-PCR Standards em associação com o lote do reagente de amplificação.

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

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

- for iniciado um novo lote de reagentes de amplificação,
- os resultados da análise de Controlo da qualidade (ver o parágrafo seguinte) se encontrarem fora da especificação,
- for realizada qualquer manutenção significativa no instrumento.

Controlos da qualidade

Os controlos de qualidade externos devem ser usados em conformidade com as organizações de acreditação locais, estatais e federais, consoante aplicável. Os controlos de qualidade externos estão disponíveis no mercado.

PROCEDIMENTO do ELiTe BeGenius®

O procedimento para utilização do «**CMV - ELiTe MGB® Kit**» com o sistema **ELiTe BeGenius** consiste em três passos:

- verificação da prontidão do sistema
- preparação da sessão
- revisão e aprovação de resultados

Verificação da prontidão do sistema

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

- ligar o **ELiTe BeGenius** e selecionar o modo «**CLOSED**» (Fechado),
- verificar se os Calibradores (**CMV Q - PCR Standard**) foram executados, aprovados e não estão expirados (estado). Pode verificar esta situação no menu «Calibration» na página inicial,

CMV ELiTe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

- verificar se os controlos da amplificação (**CMV - Controlo positivo**, **CMV - Controlo negativo**) foram executados, aprovados e não estão expirados (estado). Pode verificar esta situação no menu «Control» na página inicial,

- escolher o tipo de execução e preparar a mesma, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pelo ELiTechGroup. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os kits ELiTe MGB, matrizes e o instrumento ELiTe BeGenius.

Os Protocolos de ensaio disponíveis para o «**CMV ELiTe MGB® Kit**» estão descritos na tabela seguinte.

Protocolos de ensaio para o «CMV ELiTe MGB® Kit» e o ELiTe InGenius			
Nome	Matriz	Unidade do relatório	Características
CMV ELiTe_Be_WB_200_100	Sangue Total	gEq/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo Interno: 10 µL Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
CMV ELiTe_Be_PL_200_100	Plasma	gEq/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo Interno: 10 µL Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

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

Os protocolos para análise qualitativa estão disponíveis a pedido.

Preparação da sessão

O **CMV ELiTe MGB® Kit** em associação com o **ELiTe BeGenius** pode ser usado para:

- Execução da amostra (EXTR + PCR),
- Execução de amplificação (PCR Only) (apenas PCR),
- Execução da calibração (PCR Only) (apenas PCR),
- Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only).

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 BeGenius** 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.

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

A. Execução da amostra

Para configurar uma execução integrada, execute os passos seguintes de acordo com a **Interface gráfica do utilizador (GUI) do SW:**

- Descongele os tubos da **CMV Q - PCR Mix** à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos em número suficiente para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Descongele a CMV Q - PCR Mix num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

- Descongele os tubos CPE à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos em número suficiente para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para 12 extrações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
- Retire os Suportes da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
- Selecione o "run mode": "Extract + PCR" (Extração + PCR).
- Carregue as amostras nos Racks 5 e 4 (comece sempre com o Rack 5).
- Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.

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

- Verifique o Volume de entrada de extração (200 µL) e o Volume de eluição extraído (100 µL).
- Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (isto é, CMV ELITE_Be_PL_200_100). Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Se usado, repita os passos 7 a 9 para o Rack 4..
- Carregue os tubos de eluato nos Racks 3 e 2 (comece sempre com o Rack 3)..

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

- Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Se usado, repita o passo 12 para o Rack 2..
- Carregue o CPE e a CMV Q-PCR Mix no Rack 1.
- Insira o Rack 1 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue o Cesto com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue o Cesto com os cartuchos de extração "ELITE InGenius SP 200" e os consumíveis de extração necessários seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o **ELITE BeGenius** permite ao utilizador ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

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

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

Nota: A PCR Mix pode ser utilizada para 5 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

B. Execução da amplificação

Para preparar a execução de amplificação, com amostras eluídas, efetue os passos a seguir em conformidade com a GUI:

- Descongele os tubos da CMV Q - PCR Mix à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos em número suficiente para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Descongele a CMV Q - PCR Mix num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

- Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
- Retire os Suportes 1, 2 e 3 da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
- Selecione o "run mode": "PCR Only".
- Carregue as amostras nos Racks 3 e 2 (comece sempre com o Rack 3).
- Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Mesmo que não seja efetuada a extração, verifique o Volume de entrada de extração (200 µL) e o Volume de eluição extraído (100 µL).
- Selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (por ex., CMV ELITE_Be_PL_200_100). Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Repita os passos 7 a 9 para o Rack 2
- Carregue CMV Q-PCR Mix no Rack 1.
- Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue o Cesto com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o **ELITE BeGenius** permite ao utilizador ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

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

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

Nota: A PCR Mix pode ser utilizada para 5 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

C. Execução de calibração

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

- Descongele os tubos da CMV Q - PCR Mix à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos em número suficiente para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Descongele a CMV Q - PCR Mix num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

- Descongele os tubos CMV Q - PCR Standard (Cal1: CMV Q-PCR Standards 10², Cal2: CMV Q-PCR Standards 10³, Cal3: CMV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: CMV Q-PCR Standards 10⁵) à

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
4. Retire os Suportes 1, 2 e 3 da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
5. Selecione o "run mode": "PCR Only".
6. Carregue os tubos do Calibrador no Rack 3.
7. Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
8. Selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (CMV ELITE_Be_STD). Clique no botão "Next" para continuar a preparação. .
9. Carregue a CMV Q-PCR Mix no Rack 2.
10. Insira o Rack 2 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
12. Carregue o cesto com a "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
13. Feche a porta do instrumento.
14. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o **ELITE BeGenius** permite ao utilizador ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

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

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

Nota: A PCR Mix pode ser utilizada para 5 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

D. Execução de Positive Control e Negative Control

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

1. Descongele os tubos da CMV Q - PCR Mix à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos em número suficiente para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Descongele a CMV Q - PCR Mix num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

2. Descongele um tubo de CMV - ELITE Positive Control à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos para a amplificação do controlo positivo. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Transfira pelo menos 50 µL da água de qualidade para biologia molecular (como Negative Control) para a sessão num tubo Elução, fornecido com o ELITE InGenius SP Consumable Set.
4. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
5. Retire os Suportes 1, 2 e 3 da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
6. Selecione o "run mode": "PCR Only".
7. Carregue os tubos de Positive Control e Negative Control no Rack 3.
8. Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

9. Selecione o protocolo de ensaio a utilizar "CMV ELITE_Be_PC" and "CMV ELITE_Be_NC" na coluna "Assay". Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue a HHV8 Q-PCR Mix no Rack 2.
11. Insira o Rack 2 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
12. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
13. Carregue o cesto com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
14. Feche a porta do instrumento.
15. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o **ELITE BeGenius** permite ao utilizador ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

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

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

Nota: A PCR Mix pode ser utilizada para 5 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

Revisão e aprovação de resultados

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

Nota: O sistema **ELITE BeGenius** 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 **ELITE BeGenius** gera os resultados utilizando o CMV ELITE MGB Kit através do seguinte procedimento:

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

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

**CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO do ELITE
InGenius e ELITE BeGenius**

Sensibilidade analítica: Limite de deteção

A sensibilidade analítica deste ensaio, como Limite de deteção (LoD) da amplificação de ADN, permite detetar a presença de cerca de 10 cópias em 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

O LoD deste ensaio foi testado usando o ADN de plasmídeo que contém o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. O ADN de plasmídeo foi diluído a um título de 10 cópias/20 µL no ADN genómico humano a um título de 500 ng/20 µL. Esta amostra foi testada em 12 réplicas a realizarem a amplificação por produtos ELITEchGroup S.p.A. em dois instrumentos ELITE InGenius diferentes.

Amostras	N	positivo	negativo
10 cópias de ADN de plasmídeo + 500 ng de ADN genómico humano	24	23	1

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com diferentes matrizes e o **ELITE InGenius** foi verificada com um painel de diluições de CMV dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da "1.ª norma internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/162, Reino Unido) em ADN CMV - matriz negativa. O painel era constituído por, pelo menos, seis pontos à volta da concentração limite. Cada amostra do painel foi testada em, pelo menos, 12 réplicas realizando todo o procedimento de análise, preparação da execução, extração de ácidos nucleicos, amplificação em tempo real e interpretação de dados com o **ELITE InGenius** e produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

Os resultados finais de cada matriz são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção com o ELITE InGenius (IU/mL)				
Volume da amostra	Matriz	95% de positividade	intervalo de 95% de confiança	
			limite inferior	limite superior
200 µL	sangue total	109 IU/mL	71 IU/mL	239 IU/mL
	plasma	88 IU/mL	50 IU/mL	291 IU/mL
	líquido cefalorraquidiano	58 IU/mL	48 IU/mL	82 IU/mL
	urina	151 IU/mL	119 IU/mL	214 IU/mL
	esfregaço bucal	44 IU/mL	36 IU/mL	57 IU/mL
	líquido amniótico	57 IU/mL	46 IU/mL	78 IU/mL
1000 µL	plasma	17 IU/mL	14 IU/mL	22 IU/mL

A sensibilidade analítica como gEq/mL para cada matriz é calculada através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 24.

A sensibilidade analítica como gEq/mL está reportada a seguir.

Limite de deteção com o ELITE InGenius (gEq/mL)				
Volume da amostra	Matriz	95% de positividade	intervalo de 95% de confiança	
			limite inferior	limite superior
200 µL	sangue total	156 gEq/mL	99 gEq/mL	332 gEq/mL
	plasma	293 gEq/mL	167 gEq/mL	970 gEq/mL
	líquido cefalorraquidiano	193 gEq/mL	160 gEq/mL	273 gEq/mL
	urina	216 gEq/mL	170 gEq/mL	306 gEq/mL
	esfregaço bucal	220 gEq/mL	180 gEq/mL	285 gEq/mL
	líquido amniótico	285 gEq/mL	230 gEq/mL	390 gEq/mL
1000 µL	plasma	57 gEq/mL	47 gEq/mL	73 gEq/mL

Foi verificado o valor do LdC calculado para matrizes de **sangue total** e **plasma** (volume da amostra de 200 µL) em associação com o **ELITE InGenius** e o **ELITE BeGenius** através de testes a 20 réplicas de sangue total colhido em EDTA e 20 réplicas de Plasma colhido em amostras EDTA reforçadas por material de referência certificado CMV (1ª Norma Internacional da OMS, NIBSC) a uma concentração reivindicada. O LoD é confirmado se, pelo menos, 18 em 20 réplicas derem resultado positivo em conformidade com a norma CLSI EP17-A.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de sangue total e plasma e o ELITE InGenius					
Amostra	Título	Alvo	N	Positivo	Negativo
Sangue total colhido em EDTA	109 IU/mL	CMV	20	20	0
Plasma colhido em EDTA	88 IU/mL	CMV	20	20	0

Limite de deteção para amostras de sangue total e plasma e o ELITE BeGenius					
Amostra	Título	Alvo	N	Positivo	Negativo
Sangue total colhido em EDTA	109 IU/mL	CMV	20	20	0
Plasma colhido em EDTA	88 IU/mL	CMV	20	19	1

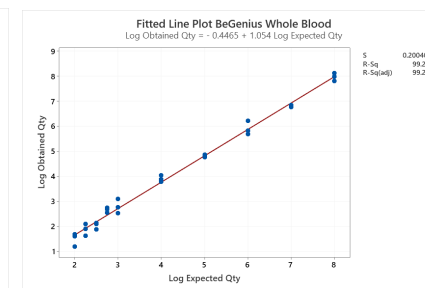
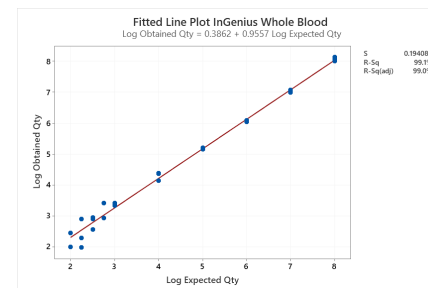
O valor do LdD para o alvo CMV foi confirmado a 109 IU/mL para sangue total colhido em EDTA e a 88 IU/mL para plasma colhido em EDTA.

Intervalo de medição linear

Sangue Total:

O intervalo de medição linear do CMV ELITE MGB® Kit usado em associação com Sangue Total e o **ELITE InGenius** e o **ELITE BeGenius** foi testado usando um painel preparado através da diluição de material de referência CMV (Notovir Itália) em ADN de CMV - matriz negativa. O painel era constituído por oito pontos de diluição a partir de 10⁸ a 10² IU / mL. Cada amostra do painel foi testada em 3 réplicas.

A análise dos dados obtidos, realizada pela regressão linear, demonstrou que o ensaio, em associação com amostras de sangue total, mostra uma resposta linear para todos os níveis de diluição com um coeficiente de correlação ao quadrado (R²) igual a 0,991 para o **ELITE InGenius** e 0,992 para o **ELITE BeGenius**.



O Limite inferior de quantificação (LLOQ) foi definido à concentração que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,2702 Registro IU/mL para o ELITE InGenius e 0,1925 Registro IU/mL para o ELITE BeGenius) e exatos (Bias igual a 0,3453 Registro IU/mL para o ELITE InGenius e -0,1462 Registro IU/mL para o ELITE BeGenius): 178 IU/mL.

O Limite superior de quantificação (ULOQ) foi definido à concentração mais alta testada que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,0597 Registro IU/mL para o ELITE InGenius e 0,1590 Registro IU/mL para o ELITE BeGenius) e exatos (Bias igual a -0,0683 Registro IU/mL para o ELITE InGenius e 0,0249 Registro IU/mL para o ELITE BeGenius): 100.000.000 IU/mL.

O intervalo de medição linear como gEq/mL para sangue total é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 33.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

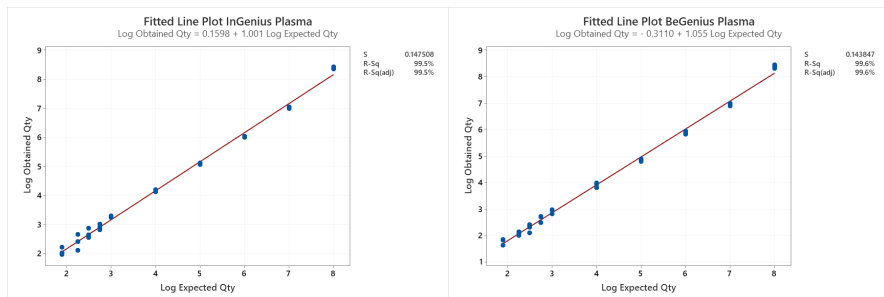
Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear para amostras de sangue total e o ELITE InGenius e ELITE BeGenius		
Unidade de medida	limite inferior	limite superior
IU/mL	178	100.000.000
gEq/mL	254	142.857.143

Plasma (volume da amostra de 200 µL):

O intervalo de medição linear do CMV ELITE MGB® Kit usado em associação com Plasma e o ELITE InGenius e o ELITE BeGenius foi testado usando um painel preparado através da diluição de material de referência CMV (Notovir, Itália) em ADN de CMV - matriz negativa. O painel era constituído por oito pontos de diluição a partir de 10⁸ a 80 IU / mL. Cada amostra do painel foi testada em 3 réplicas.

A análise dos dados obtidos, realizada por análise da regressão linear, demonstrou que o ensaio, em associação com amostras de plasma, mostra uma resposta linear para todas as diluições com um coeficiente de correlação quadrado (R²) igual a 0,995 para o ELITE InGenius e 0,996 para o ELITE BeGenius.



O Limite inferior de quantificação (LLOQ) foi definido à concentração do LoD que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,2701 Registo IU/mL para o ELITE InGenius e 0,2114 Registo IU/mL para o ELITE BeGenius) e exatos (viés igual a 0,3314 Registo IU/mL para o ELITE InGenius e -0,0619 Registo IU/mL para o ELITE BeGenius): 88 IU/mL.

O Limite superior de quantificação (ULOQ) foi definido à concentração mais alta testada que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,0351 Registo IU/mL para o ELITE InGenius e 0,0675 Registo IU/mL para o ELITE BeGenius) e exatos (Bias igual a -0,3988 Registo IU/mL para o ELITE InGenius e -0,3865 Registo IU/mL para o ELITE BeGenius): 100.000.000 IU/mL.

O intervalo de medição linear como gEq/mL para Plasma é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 33.

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear para amostras de plasma e o ELITE InGenius e ELITE BeGenius		
Unidade de medida	limite inferior	limite superior
IU/mL	88	100.000.000
gEq/mL	293	333.333.334

Outras matrizes

A linearidade deste ensaio usado em conjunto com o ELITE InGenius foi verificada com um painel de diluições de CMV nas seguintes matrizes diferentes: plasma (volume da amostra 1000 µL), líquido cefalorraquidiano, urina, esfregaço bucal, líquido amniótico, LBA/AB.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

A linearidade no modo "PCR Only" deste ensaio foi determinada usando um painel de diluições (passos de diluição de 1 registo10) de ADN de plasmídeo contendo o produto de amplificação, cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. As diluições de 2 x 10⁶ equivalentes do genoma por reação a 2 x 10¹ equivalentes do genoma por reação foram testadas em 5 réplicas através da realização da amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise dos dados obtidos, realizada por regressão linear, demonstrou que o ensaio mostra uma resposta linear para todas as diluições (coeficiente de correlação quadrado superior a 0,99).

A linearidade no modo "Extract+PCR" deste ensaio usado em associação com diferentes matrizes e o ELITE InGenius foi verificada com um painel de diluições de CMV. O painel foi preparado através da diluição da "1.ª norma internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/162, Reino Unido) em ADN CMV - matriz negativa. O painel era constituído por cinco pontos de diluição (passos de diluição de 1 Registo10) a partir de 10⁶ IU/mL a 10² IU/mL. Cada amostra do painel foi testada em, pelo menos, 3 réplicas realizando todo o procedimento de análise, preparação da execução, extração de ácidos nucleicos, amplificação em tempo real e interpretação de dados com o ELITE InGenius e produtos ELITechGroup S.p.A. A análise dos dados obtidos, realizada por regressão linear, demonstrou que o ensaio mostra uma resposta linear para todos os níveis de diluição.

Limites de quantificação

O limite inferior do intervalo de medição linear foi definido à concentração mais baixa a fornecer 100% de positividade e resultados quantitativos exatos e precisos dentro do Registo ±0,5 IU / mL. O limite superior do intervalo de medição linear foi definido à concentração testada mais alta que fornece resultados quantitativos exatos e precisos dentro do Registo ±0,5 IU / mL.

O intervalo de medição linear como gEq/mL para cada matriz é calculada através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 32.

Os resultados de cada matriz são comunicados nas tabelas seguintes.

Intervalo de medição linear para amostras de plasma e o ELITE InGenius			
Volume da amostra	Unidade de medida	limite inferior	limite superior
1000 µL	IU/mL	178	1.500.000
	gEq/mL	593	5.000.000

Intervalo de medição linear para amostras de líquido cefalorraquidiano e o ELITE InGenius			
Volume da amostra	Unidade de medida	limite inferior	limite superior
200 µL	IU/mL	101	15.000.000
	gEq/mL	335	50.000.000

Intervalo de medição linear para amostras de urina e o ELITE InGenius			
Volume da amostra	Unidade de medida	limite inferior	limite superior
200 µL	IU/mL	316	35.000.000
	gEq/mL	451	50.000.000

Intervalo de medição linear para amostras de esfregaço bucal e o ELITE InGenius			
Volume da amostra	Unidade de medida	limite inferior	limite superior
200 µL	IU/mL	100	10.000.000
	gEq/mL	500	50.000.000

Intervalo de medição linear para amostras de líquido amniótico e o ELITE InGenius			
Volume da amostra	Unidade de medida	limite inferior	limite superior
200 µL	IU/mL	100	10.000.000
	gEq/mL	500	50.000.000

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

Intervalo de medição linear para amostras BAL/BA e o ELITE InGenius			
Volume da amostra	Unidade de medida	limite inferior	limite superior
200 µL	IU/mL	178	10.000.000
	gEq/mL	890	50.000.000

Repetibilidade

A Repetibilidade dos resultados obtidos pelo produto CMV ELITE MGB Kit em associação com os sistemas **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** foi testada através da análise de um painel de amostras de Sangue total colhido em EDTA. O painel incluiu uma amostra negativa e duas amostras reforçadas com material de referência certificado CMV ("1.ª Norma internacional da OMS para ADN do citomegalovírus (código NIBSC 09/162, Reino Unido) a uma concentração de 3 x LdD (cerca de 327 IU/mL) e de 10 x LdD (cerca de 1090 IU/mL).

A Repetibilidade intra-sessão no **ELITE InGenius** foi obtida através da análise de amostras do painel em oito réplicas, em duas execuções por dia, com o mesmo lote do produto, no mesmo instrumento, pelo mesmo operador, no mesmo dia. As amostras foram processadas em posições aleatórias no sistema **ELITE InGenius** no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

A Repetibilidade inter-sessão no **ELITE InGenius** foi obtida através da análise de amostras do painel em oito réplicas, em duas execuções por dia, com o mesmo lote do produto, no mesmo instrumento, pelo mesmo operador, em dois dias diferentes. As amostras foram processadas em posições aleatórias no sistema **ELITE InGenius** no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

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

Nas tabelas seguintes é apresentado um resumo dos resultados.

Repetibilidade intra-sessão ELITE InGenius								
Amostra	CMV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	24,18	0,17	0,69
3 x LoD	8 / 8	35,91	0,51	1,42				
10 x LoD	8 / 8	33,98	0,29	0,86				

Repetibilidade inter-sessão ELITE InGenius								
Amostra	CMV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	48 / 48	24,20	0,22	0,90
3 x LoD	16 / 16	36,09	0,78	2,15				
10 x LoD	16 / 16	34,07	0,25	0,75				

No teste da Repetibilidade no **ELITE InGenius**, o ensaio detetou o CMV alvo como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores Ct que não excederam 2,2% para CMV e 0,9% para o Controlo Interno.

A Repetibilidade intra-sessão no **ELITE InGenius** foi obtida através da análise de amostras do painel em oito réplicas, numa execução por dia, com o mesmo lote do produto, no mesmo instrumento, pelo mesmo operador, no mesmo dia. As amostras foram processadas em posições aleatórias no sistema **ELITE BeGenius** no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

A Repetibilidade inter-sessão no **ELITE BeGenius** foi obtida através da análise de amostras do painel em oito réplicas, numa execução por dia, com o mesmo lote do produto, no mesmo instrumento, pelo mesmo operador, em dois dias diferentes. As amostras foram processadas em posições aleatórias no sistema **ELITE BeGenius** no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

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

Nas tabelas seguintes é apresentado um resumo dos resultados.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

Repetibilidade intra-sessão ELITE BeGenius								
Amostra	CMV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	27,21	0,38	1,39
3 x LoD	8 / 8	37,21	0,49	1,33				
10 x LoD	8 / 8	35,03	0,52	1,48				

Repetibilidade inter-sessão ELITE BeGenius								
Amostra	CMV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	48 / 48	27,18	0,37	1,38
3 x LoD	16 / 16	37,51	0,61	1,63				
10 x LoD	16 / 16	35,06	0,44	1,25				

No teste da Repetibilidade no **ELITE BeGenius**, o ensaio detetou o CMV alvo como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores Ct que não excederam 1,6% para CMV e 1,4% para o Controlo Interno.

Reprodutibilidade

A Capacidade de reprodução dos resultados obtidos pelo produto CMV ELITE MGB Kit em associação com os sistemas **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** foi testada através da análise de um painel de amostras de sangue total. O painel incluiu uma amostra negativa e duas amostras reforçadas com material de referência certificado de CMV ("3.ª Norma internacional da OMS para ADN de citomegalovírus (código NIBSC 09/162, Reino Unido) a uma concentração de 3 x LdD (cerca de 327 IU/mL) e de 10 x LdD (cerca de 1090 IU/mL).

A Capacidade de reprodução inter-instrumento no **ELITE InGenius** foi obtida através da análise de amostras do painel em oito réplicas, em uma execução por dia, em dois dias, usando o mesmo lote e com dois instrumentos diferentes e por dois operadores diferentes. As amostras foram processadas em posições aleatórias no sistema **ELITE InGenius** no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

A Capacidade de reprodução inter-lote no **ELITE InGenius** foi obtida através da análise de amostras do painel em oito réplicas, em duas execuções por dia, com dois lotes diferentes e no mesmo instrumento pelo mesmo operador. As amostras foram processadas em posições aleatórias no sistema **ELITE InGenius** no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

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

Na tabela seguinte é apresentado um resumo dos resultados.

Capacidade de reprodução inter-instrumento ELITE InGenius								
Amostra	CMV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	25,31	0,71	2,82
3 x LoD	8 / 8	35,96	0,81	2,26				
10 x LoD	8 / 8	33,62	0,36	1,07				

Repetibilidade interlote ELITE InGenius								
Amostra	CMV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	25,20	0,65	2,59
3 x LoD	8 / 8	35,97	0,65	1,82				
10 x LoD	8 / 8	33,72	0,29	0,86				

No teste da Capacidade de reprodução no **ELITE InGenius**, o ensaio detetou o CMV alvo como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores Ct que não excederam 2,3% para CMV e 2,8% para o Controlo Interno.

A Reprodutibilidade inter-instrumento no **ELITE BeGenius** foi obtida através da análise de amostras do painel em oito réplicas, numa execução por dia, em dois dias, usando o mesmo lote e com dois instrumentos diferentes e por dois operadores diferentes. As amostras foram processadas em posições aleatórias no sistema **ELITE BeGenius** no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

CMV ELiTe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

A Reprodutibilidade no **ELiTe BeGenius** foi obtida através da análise de amostras do painel em oito réplicas, em duas execuções por dia, com dois lotes diferentes e no mesmo instrumento pelo mesmo operador. As amostras foram processadas em posições aleatórias no sistema **ELiTe BeGenius** no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

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

Na tabela seguinte é apresentado um resumo dos resultados.

Capacidade de reprodução inter-instrumento ELiTe BeGenius								
Amostra	CMV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	28,29	0,48	1,69
3 x LoD	8 / 8	36,06	0,46	1,27				
10 x LoD	8 / 8	34,12	0,23	0,66				

Repetibilidade interlote ELiTe BeGenius								
Amostra	CMV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	28,30	0,47	1,65
3 x LoD	8 / 8	36,19	0,51	1,41				
10 x LoD	8 / 8	34,22	0,12	0,36				

No teste da Reprodutibilidade no **ELiTe BeGenius**, o ensaio detetou o CMV alvo como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores da Ct que não excederam 1,4% para CMV e 1,7% para o Controlo Interno.

Capacidade de reprodução com material de referência certificado

A sensibilidade analítica do ensaio foi avaliada utilizando como material de referência o painel calibrado «Painel "Q" Molecular CMV» (Qnostics Ltd, RU). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, deteção e interpretação do resultado, com o sistema **ELiTe InGenius** e produtos ELiTechGroup S.p.A.

Os resultados, obtidos a partir de 200 µL de amostra, são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o ELiTe InGenius				
Amostra	Título nominal IU/mL	Registo IU/mL do título nominal	Positivo/réplicas	Resultados médios IU/mL de Registo
CMVMQP01-Alto	10 ⁵	5,000	2/2	5,024
CMVMQP01-Médio	10 ⁴	4,000	2/2	3,996
CMVMQP01-Baixo	10 ³	3,000	2/2	3,060
CMVMQP01-Negativo	negativo	-	0/2	-

Todas as amostras positivas foram detetadas como positivas com um título que se encontra dentro do valor esperado de Registo ± 0,5.

Os resultados, obtidos a partir de 1000 µL de amostra, são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o ELiTe InGenius				
Amostra	Título nominal IU/mL	Registo IU/mL do título nominal	Positivo/réplicas	Resultados médios IU/mL de Registo
CMVMQP01-Alto	10 ⁵	5,000	2/2	4,679
CMVMQP01-Médio	10 ⁴	4,000	2/2	3,717
CMVMQP01-Baixo	10 ³	3,000	2/2	2,733
CMVMQP01-Negativo	negativo	-	0/2	-

Todas as amostras positivas foram detetadas como positivas com um título que se encontra dentro do valor esperado de Registo ± 0,5.

CMV ELiTe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência calibrado o painel «Painel EQA ADN do Citomegalovirus humano QCMD 2014» (Qnostics Ltd, RU). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, deteção e interpretação do resultado, com o **ELiTe InGenius** e produtos ELiTechGroup S.p.A.

Os resultados em IU/mL foram calculados através da aplicação do fator de conversão para o **ELiTe InGenius** e plasma e são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o ELiTe InGenius				
Amostra	Consenso Registo IU/mL	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios IU/mL de Registo
CMVDNA14-01	2,468	0,343	2/2	2,256
CMVDNA14-02	3,034	0,281	2/2	2,915
CMVDNA14-03	3,383	0,368	2/2	3,185
CMVDNA14-04	3,014	0,251	2/2	2,976
CMVDNA14-05	1,859	0,462	2/2	1,706
CMVDNA14-06	2,767	0,325	2/2	2,526
CMVDNA14-07	4,030	0,280	2/2	3,924
CMVDNA14-08	Negativo	-	0/2	-
CMVDNA14-09	2,065	0,512	2/2	1,273
CMVDNA14-10	3,947	0,278	2/2	3,946

Todas as amostras foram detetadas corretamente. Oito (8) em nove amostras positivas foram quantificadas dentro do intervalo definido pelo Desvio Padrão (SD) EQA Consensus ± 1 e uma amostra (CMVDNA14-09) foi quantificada dentro do 2 SD. Isto pode explicar-se pelo facto de o título de amostra estar abaixo do limite inferior de quantificação.

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência o painel calibrado «Painel AcroMatrix® CMV_{ic}» (Acrometrix, Life Technologies, EUA). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, deteção e interpretação do resultado, com o **ELiTe InGenius** e produtos ELiTechGroup S.p.A.

Os resultados em IU/mL foram calculados através da aplicação do fator de conversão para o **ELiTe InGenius** e plasma e são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o ELiTe InGenius				
Amostra	Título nominal IU/mL	Registo IU/mL do título nominal	Positivo/réplicas	Resultados médios IU/mL de Registo
CMV ADN 3E6	3.000.000	6,477	2/2	6,386
CMV ADN 3E5	300.000	5,477	2/2	5,444
CMV ADN 3E4	30.000	4,477	2/2	4,473
CMV ADN 3E3	3.000	3,477	2/2	3,441
CMV ADN 3E2	300	2,477	2/2	2,575

Todas as amostras foram detetadas como positivas, com um título que se encontra dentro do valor esperado de Registo ± 0,5.

Foram realizados testes adicionais, a partir de 1000 µL de amostra, utilizando como material de referência calibrado o painel «Painel EQA ADN do Citomegalovirus humano QCMD 2017» (Qnostics Ltd, RU). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, deteção e interpretação do resultado, com o **ELiTe InGenius** e produtos ELiTechGroup S.p.A.

Os resultados em IU/mL foram calculados através da aplicação do fator de conversão para o **ELiTe InGenius** e plasma e são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o ELiTe InGenius			
Amostra	Consenso Registo IU/mL	Positivo/réplicas	Resultados médios IU/mL de Registo
CMVDNA17S-01	2,431	2/2	2,362
CMVDNA17S-02	3,762	2/2	3,665
CMVDNA17S-03	3,920	2/2	3,822

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

Testes com materiais de referência calibrados e o ELITE InGenius			
CMVDNA17S-04	2,847	2/2	2,671
CMVDNA17S-05	2,572	2/2	2,189
CMVDNA17S-06	2,849	2/2	2,658
CMVDNA17S-07	3,902	2/2	3,785
CMVDNA17S-08	3,746	2/2	3,667
CMVDNA17S-09	Negativo	0/2	-
CMVDNA17S-10	3,900	2/2	3,707

Todas as amostras foram detetadas corretamente. As amostras positivas foram comunicadas com um título que se encontra dentro do valor esperado de Registo $\pm 0,5$.

Fator de conversão para unidades internacionais

O fator de conversão, para converter um resultado quantitativo de gEq/mL para Unidades internacionais/mL, foi calculado utilizando um painel de, pelo menos, três diluições (1 Registo entre diluições) de material de referência calibrado aprovado pela OMS ("1.ª Norma Internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico", NIBSC código 09/162, Reino Unido) em diferentes matrizes testadas negativas para ADN de CMV.

Cada ponto do painel foi testado em, pelo menos, 10 réplicas realizando toda a análise, extração, amplificação, deteção e interpretação do resultado, com o ELITE InGenius e produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados de cada matriz são resumidos na tabela seguinte.

Fator de conversão para unidades internacionais com o ELITE InGenius		
Volume da amostra	Matriz	Fc (IU/gEq)
200 µL	sangue total	0,7
	plasma	0,3
	líquido cefalorraquidiano	0,3
	urina	0,7
	estregação bucal	0,2
	líquido amniótico	0,2
	BAL/BA	0,2
1000 µL	plasma	0,3

O fator de conversão do CMV ELITE MGB® Kit usado em associação com **Sangue Total** colhido em EDTA e os **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** foi verificado com um painel de diluições de CMV. O painel foi preparado através da diluição da "1.ª norma internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/162, Reino Unido) em ADN CMV - matriz negativa. O painel é composto por sete pontos de diluição com cerca de 10^6 IU / mL a 10^{25} IU / mL. Cada amostra do painel foi testada em 3 réplicas.

A precisão da quantificação do alvo, como um desvio padrão de Registo IU/mL, foi menor que um Registo de 0,5 tanto para o **ELITE InGenius** e o **ELITE BeGenius**.

A precisão da quantificação do alvo, com uma diferença entre as concentrações teóricas e medidas num Registo de 0,5 tanto para o **ELITE InGenius** e o **ELITE BeGenius**.

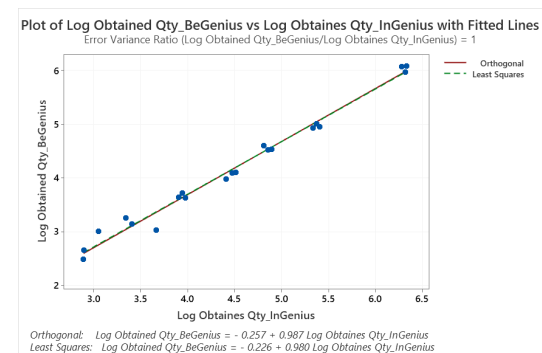
Estes resultados confirmaram o fator de conversão calculados para sangue total com o **ELITE InGenius**.

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

Os resultados estão resumidos na figura seguinte.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD



A análise de regressão ortogonal gerou um declive igual a -0,257 (95% CI: -0,503; -0,011) e um declive igual a 0,987 (95% IC: 0,934 – 1,040). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0,986.

O fator de conversão do CMV ELITE MGB® Kit usado em associação com **Sangue Total** colhido em EDTA (volume da amostra 200 µL) e os **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** foi verificado com um painel de diluições de CMV. O painel foi preparado através da diluição da "1.ª norma internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/162, Reino Unido) em ADN CMV - matriz negativa. O painel consistiu em oito pontos de diluição com cerca de 10^6 IU / mL a 10^2 IU / mL. Cada amostra do painel foi testada em 3 réplicas.

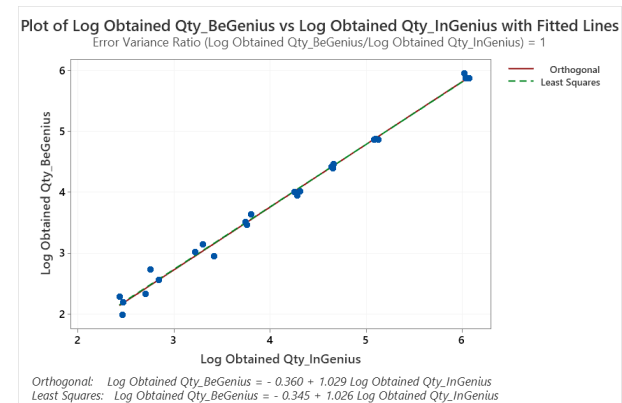
A precisão da quantificação do alvo, como um desvio padrão de Registo IU/mL, foi menor que um Registo de 0,5 tanto para o **ELITE InGenius** e o **ELITE BeGenius**.

A precisão da quantificação do alvo, com uma diferença entre as concentrações teóricas e medidas num Registo de 0,5 tanto para o **ELITE InGenius** e o **ELITE BeGenius**.

Estes resultados confirmaram os fatores de conversão calculados para sangue total com o **ELITE InGenius**.

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

Os resultados estão resumidos na figura seguinte.



Neste teste, a análise da regressão ortogonal gerou um declive igual a 1,029 (95% CI: 0,993 - 1,065) e uma interceção igual a -0,360 (95% CI: -0,510; -0,209). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0,993.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

Robustez: ausência de contaminação cruzada

A robustez do ensaio, enquanto ausência de contaminação cruzada, foi verificada através da análise dos resultados de cinco sessões, em que as amostras negativas para ADN de CMV foram alternadas com amostras reforçadas com ADN de CMV. Nenhuma das amostras negativas para ADN de CMV teve resultado positivo.

A ausência de contaminação cruzada foi verificada com recurso a uma amostra de sangue total negativa para ADN de CMV e reforçada com material de referência calibrado aprovado pela OMS ("1.ª Norma Internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico", NIBSC código 09/162, Reino Unido) para uma carga viral de 10.000 IU/mL e uma amostra de sangue total negativa para ADN de CMV. Foram testadas cinco séries de 12 amostras, alternando uma amostra reforçada com uma amostra negativa, através da realização de todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação de resultados com o **ELITE InGenius** e com produtos ELITechGroup S.p.A.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA reforçado com ADN de CMV	30	30	0
Sangue total colhido em EDTA negativo para ADN de CMV	30	0	30

Robustez: taxa de falha de todo o sistema

A robustez do ensaio, como taxa de falha de todo o sistema que resulta em falsos resultados negativos, foi verificada através da análise de um painel de ADN de CMV reforçado a amostras de título baixo e com resultado igual a 1,7%.

A taxa de falha de todo o sistema foi verificada utilizando amostras de sangue total negativas para ADN de CMV reforçadas com material de referência calibrado e certificado CMVDNA12-01 do "Painel EQA de Citomegalovirus humano QCMD 2012" (Qnostics, Reino Unido), a uma carga viral de 750 IU/mL.

Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação de resultados com o **ELITE InGenius** e com produtos ELITechGroup S.p.A. Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA reforçado com ADN de CMV	60	59	1

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

Sangue total e plasma (volume da amostra 200 µL):

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada através da análise de algumas amostras clínicas positivas para ADN de CMV em associação com o **ELITE InGenius**. Como o **ELITE BeGenius** mostrou desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITE InGenius**. Dado que o **ELITE BeGenius** tem desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITE InGenius**, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a sensibilidade do diagnóstico do ensaio obtido em associação com o **ELITE InGenius** também se aplica ao **ELITE BeGenius**.

O teste, começando a partir de 200 µL de amostra, foi realizado em:

- 60 amostras de sangue total colhido em EDTA que estavam positivas para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD).
- 54 amostras de plasma colhido em EDTA de pacientes que estavam positivos para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD).

Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação de resultados com o **ELITE InGenius** e com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

Volume da amostra	Amostras	N	positivo	negativo
200 µL	Sangue total colhido em EDTA e positivo para ADN de CMV	60	60	0
	Plasma colhido em EDTA e positivo para ADN de CMV	54	54	0

Todas as amostras de sangue total e plasma foram confirmadas positivas. A sensibilidade de diagnóstico do ensaio nestes testes foi igual a 100% para amostras de sangue total e plasma.

Outras matrizes

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada através da análise de algumas amostras clínicas positivas para ADN de CMV em associação com o **ELITE InGenius** e as seguintes matrizes: plasma (volume da amostra 1000 µL), líquido cefalorraquidiano, urina, esfregaço bucal, líquido amniótico, LBA/AB.

O teste, começando a partir de 200 µL de amostra, foi realizado em:

- 20 amostras de líquido cefalorraquidiano negativas para ADN de CMV, que foram reforçadas para ADN de CMV através da adição da "1.ª Norma internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/162, Reino Unido).
- 31 amostras de urina de pacientes que estavam positivos para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD).
- 50 amostras de esfregaço bucal negativas para ADN de CMV, que foram reforçadas para ADN de CMV através da adição da "1.ª Norma internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/162, Reino Unido).
- 11 amostras de líquido amniótico de pacientes que estavam positivos para ADN de CMV (testadas como produto de amplificação em tempo real CE IVD) e em 20 amostras de líquido amniótico negativas para ADN de CMV, que foram reforçadas para ADN de CMV através da adição da "1.ª Norma internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/162, Reino Unido).
- 49 amostras de BAL/BA de pacientes que estavam positivos para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD).

O teste, iniciado a partir de 1000 µL de amostra, foi realizado em 60 amostras de plasma colhido em EDTA de pacientes que estavam positivos para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD).

Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação de resultados com o **ELITE InGenius** e com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Volume da amostra	Amostras	N	positivo	negativo
200 µL	CSF reforçado para ADN de CMV	20	20	0
	Urina positiva para ADN de CMV	31	31	0
	Esfregaço bucal reforçado para ADN de CMV	50	50	0
	Líquido amniótico positivo ou reforçado para ADN de CMV	31	31	0
1000 µL	BAL/BA positivo para ADN de CMV	49	49	0
	Plasma colhido em EDTA e positivo para ADN de CMV	60	58	2

Todas as amostras de todas as matrizes, analisadas a partir de 200 µL de volume, foram confirmadas positivas. A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, nestes testes, foi igual a 100% para cada matriz.

Todas as amostras de plasma, analisadas a partir de 1000 µL de volume, foram válidas para análise, 58 em 60 amostras de plasma foram confirmadas positivas, duas amostras foram discrepantes negativas.

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 96,6%.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

Sangue total e plasma (volume da amostra 200 µL):

A especificidade do diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi avaliada através da análise de algumas amostras clínicas negativas para ADN de CMV em associação com o **ELITE InGenius**. Dado que o **ELITE BeGenius** tem desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITE InGenius**, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a sensibilidade do diagnóstico do ensaio obtido em associação com o **ELITE InGenius** também se aplica ao **ELITE BeGenius**.

O teste, começando a partir de 200 µL de amostra, foi realizado em:

- 59 amostras de sangue total colhido em EDTA que estavam negativas para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD).
- 58 amostras de plasma colhido em EDTA que estavam negativas para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD),

Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação de resultados com o **ELITE InGenius** e com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Volume da amostra	Amostras	N	positivo	negativo
200 µL	Sangue total colhido em EDTA e negativo para ADN de CMV	59	4	55
	Plasma colhido em EDTA e negativo para ADN de CMV	58	1	57

Todas as amostras foram válidas para a análise. O valor-limite da Ct de CI está definido para 35 para ambas as matrizes.

Cinquenta e cinco (55) em 59 amostras de sangue total foram confirmadas como negativas para ADN de CMV, quatro amostras foram discrepantes positivas a um título baixo. Este resultado pode ser explicado, uma vez que o LoD do método de referência é mais alto que o LoD do produto sob avaliação.

A especificidade de diagnóstico do ensaio em associação com o sangue total neste teste foi igual a 93,2%.

Cinquenta e sete (57) em 58 amostras de plasma foram confirmadas como negativas para ADN de CMV, uma amostra foi discrepante positiva a um título baixo.

A especificidade de diagnóstico do ensaio em associação com o plasma neste teste foi igual a 98,3%.

Outras matrizes

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi avaliada através da análise de algumas amostras clínicas negativas para ADN de CMV em associação com o **ELITE InGenius** e as seguintes matrizes: plasma (volume da amostra 1000 µL), líquido cefalorraquidiano, urina, esfregaço bucal, líquido amniótico, LBA/AB.

O teste, começando a partir de 200 µL de amostra, foi realizado em:

- 7 amostras de CSF que estavam negativas para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD) e 3 amostras de CSF presumivelmente negativas para ADN de CMV.
- 8 amostras de urina que estavam negativas para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD) e 46 amostras de urina presumivelmente negativas para ADN de CMV.
- 52 amostras de esfregaço bucal presumivelmente negativas para ADN de CMV.
- 10 amostras de líquido amniótico que estavam negativas para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD) e 22 amostras de líquido amniótico presumivelmente negativas para ADN de CMV.
- 49 amostras BAL/BA que estavam negativas para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD).

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

O teste, começando a partir de 1000 µL de amostra, foi realizado em 57 amostras de plasma colhido em EDTA e presumivelmente negativas para ADN de CMV.

Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação de resultados com o **ELITE InGenius** e com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Volume da amostra	Amostras	N	positivo	negativo
200 µL	CSF negativo ou presumivelmente negativo para ADN de CMV	20	0	20
	Urina negativa ou presumivelmente negativa para ADN de CMV	54	0	54
	Esfregaço bucal presumivelmente negativo para ADN de CMV	52	2	50
	Líquido amniótico negativo ou presumivelmente negativo para ADN de CMV	32	0	32
	BAL/BA negativo para ADN de CMV	49	0	49
1000 µL	Plasma colhido em EDTA e presumivelmente negativo para ADN de CMV	57	3	54

Todas as amostras, analisadas a partir de 200 µL de volume, foram válidas para análise. O valor-limite da Ct de CI está definido para 35 para todas as matrizes.

Cinquenta (50) em 52 amostras de esfregaço bucal foram confirmadas como negativas para ADN de CMV, duas amostras foram discrepantes positivas a um título baixo.

A especificidade de diagnóstico do ensaio em associação com o esfregaço bucal foi igual a 96%.

Todas as amostras de líquido amniótico, urina, LCR e BAL/BA foram confirmadas como negativas para ADN de CMV.

A especificidade de diagnóstico do ensaio em associação com o líquido amniótico, urina e CSF foi igual a 100%.

Todas as amostras, analisadas a partir de 1000 µL, foram válidas para análise.

Cinquenta e quatro (54) em 57 foram confirmadas como negativas para ADN de CMV, três (3) amostras foram discrepantes positivas a um título baixo. A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 94,7%.

ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument
ABI 7300 Real-Time PCR System

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser utilizado com o **ADN extraído** das seguintes amostras clínicas:

Sangue total colhido em EDTA

As amostras de sangue total para extração de ADN devem ser colhidas em EDTA de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas a +2°/+8 °C e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de três dias, caso contrário, devem ser congeladas e guardadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos. Recomenda-se a separação das amostras a serem congeladas em alíquotas para evitar ciclos repetidos de congelamento e descongelamento. Quando utilizar amostras congeladas, descongele as mesmas apenas imediatamente antes da extração, para evitar uma possível degradação do ácido nucleico.

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de sangue total (amostra celular) através do kit «**EXTRAblood**», siga o manual de instruções de funcionamento: comece com **200 µL** da amostra, elua os ácidos nucleicos em **100 µL** de tampão de eluição.

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de sangue total com o **ELITE STAR** e com **software versão 3.4.13** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **UUNI_E100_S200_ELI**, que utiliza 200 µL de amostra e elui o extrato em 100 µL. As amostras nos tubos primários podem ser carregadas diretamente no «**ELITE STAR**». É sempre necessário um volume mínimo

CMV ELiTe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

de 700 µL para cada amostra. Adicione **200 µL** de CPE ao tubo Proteinase-Carrier como indicado no manual do kit de extração. Para o procedimento de extração, consulte o manual de instruções de utilização do kit de extração.

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de sangue total com o **ELiTe GALAXY** com **software versão 1.3.1** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **Extração xNA (Universal)**, que utiliza 300 µL de amostra e elui o extrato em 200 µL. As amostras nos tubos primários podem ser carregadas diretamente no «**ELiTe GALAXY**». É sempre necessário um volume mínimo de 400-650 µL, dependendo da classe do tubo usado, para cada amostra. Adicione **10 µL/amostra** de CPE. O CPE deve ser adicionado à **solução de CI + Carrier** como indicado no manual do kit de extração. Para o procedimento de extração, consulte o manual de instruções de utilização do kit de extração.

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de sangue total com o instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**», siga o protocolo de extração **Generic 2.0.1** e siga estas instruções: transfira **100 µL** da amostra para a tira de 8 furos, carregue a tira no instrumento e efetue a extração **sem incubação de lise**. Após o instrumento ter adicionado o **Tampão lise EasyMAG®**, sem remover a tira, misture três vezes o conteúdo da tira através da pipeta de vários canais, utilizando o número do programa 3. Faça a incubação durante 10 minutos, em seguida adicione a **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** ao conteúdo da tira pela pipeta de vários canais, utilizando o programa número 3; em seguida, prossiga com a extração. Elua os ácidos nucleicos em **50 µL** de tampão de eluição.

Note: quando realizar a extração de ADN de sangue total com o instrumento «**QIASymphony® SP/AS**» e o kit «**QIASymphony® DNA Mini Kit**» com a **versão do software 3.5**, utilize o protocolo de extração **Virus Blood 200_V4_default IC** e siga estas instruções: o instrumento é capaz de utilizar um tubo primário, o volume de amostra necessário para a extração é **200 µL**, é sempre necessário um volume morto mínimo de 100 µL. Carregue no instrumento, na ranhura do "controle interno", os tubos que contêm o tampão ATE, como indicado no manual de instruções de utilização do kit; indique a posição onde os eluatos serão distribuídos e especifique o volume de eluição de **60 µL**. Para obter mais informações sobre o procedimento de extração, siga as indicações no manual de instruções de utilização do kit.

Plasma colhido em EDTA

As amostras de plasma para extração de ácido nucleico devem ser colhidas em EDTA de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas a +2°/+8 °C e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de três dias, caso contrário, devem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

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: quando realizar a extração de ADN a partir de plasma com o **ELiTe STAR** e com **software versão 3.4.13** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **UUNI_E100_S200_ELI**, que utiliza 200 µL de amostra e elui o extrato em 100 µL. As amostras nos tubos primários podem ser carregadas diretamente no «**ELiTe STAR**». É sempre necessário um volume mínimo de 700 µL para cada amostra. Adicione **200 µL** de CPE ao tubo Proteinase-Carrier como indicado no manual do kit de extração. Para o procedimento de extração, consulte o manual de instruções de utilização do kit de extração.

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de plasma com o **ELiTe GALAXY** com **software versão 1.3.1** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **Extração xNA (Universal)**, que utiliza 300 µL de amostra e elui o extrato em 200 µL. As amostras nos tubos primários podem ser carregadas diretamente no «**ELiTe GALAXY**». É sempre necessário um volume mínimo de 400-650 µL, dependendo da classe do tubo usado, para cada amostra. Adicione **10 µL/amostra** de CPE. O CPE deve ser adicionado à **solução de CI + Carrier** como indicado no manual do kit de extração. Para o procedimento de extração, consulte o manual de instruções de utilização do kit de extração.

Nota: quando realizar a extração de ADN de plasma com o instrumento «**QIASymphony® SP/AS**» e o kit «**QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit**» com **software versão 3.5**, utilize o protocolo de extração **"Virus Cell free 500_V3_DSP_default IC"** e siga estas instruções: o instrumento é capaz de utilizar um tubo primário, o volume de amostra necessário para a extração é **500 µL**, é sempre necessário um volume morto mínimo de 100 µL. Prepare a solução que contém o tampão AVE e o ARN de acordo com o manual de instruções do kit de extração. Adicione **6 µL** de CPE à solução para cada amostra necessária. Carregue no instrumento, na ranhura do "controle interno", os tubos que contêm a solução, como indicado no manual de instruções de utilização do kit; indique a posição onde os eluatos serão distribuídos e especifique o volume de eluição de **85 µL**. Para obter mais informações sobre o procedimento de extração, siga as

CMV ELiTe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

indicações no manual de instruções de utilização do kit.

Líquido cefalorraquidiano

As amostras de líquido cefalorraquidiano para extração de ácido nucleico devem ser colhidas de acordo com as diretrizes laboratoriais evitando a contaminação pelo sangue do doente, transportadas a +2°/+8 °C e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de quatro horas, caso contrário, devem ser congeladas e guardadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

Recomenda-se a separação das amostras a serem congeladas em alíquotas para evitar ciclos repetidos de congelação e descongelação.

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de líquido cefalorraquidiano com o instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**», siga o protocolo de extração **Generic 2.0.1** e siga estas instruções: transfira **500 µL** da amostra para a tira de 8 furos e efetue a extração. Após os 10 minutos de incubação, adicione **5 µL** de CPE para o controle interno antes de adicionar a **Silica magnética NucliSENS® easyMAG®** e prossiga com a extração. Elua os ácidos nucleicos em **100 µL** de tampão de eluição.

Urina

As amostras de urina para extração de ácido nucleico devem ser colhidas em recipientes sem conservantes de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas à temperatura ambiente (+18°/+25 °C) e guardadas à temperatura ambiente (+18 / +25 °C) durante um período máximo de quatro horas, caso contrário, devem ser guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de três dias. Se possível, evite congelar amostras de primeira urina. A congelação pode causar a precipitação de inibidores e a perda de título de ADN.

É recomendado separar as amostras a serem congeladas em alíquotas para evitar ciclos repetidos de congelação e descongelação e guardadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C durante períodos mais longos.

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de amostras de urina com o instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**», siga o protocolo de extração **Generic 2.0.1** e siga estas instruções: transfira **500 µL** da amostra para a tira de 8 furos, carregue a tira no instrumento e efetue a extração. Após os 10 minutos de incubação, adicione **5 µL** de CPE para o controle interno antes de adicionar a **Silica magnética NucliSENS® easyMAG®** ao conteúdo da tira pela pipeta de vários canais, utilizando o programa número 3; em seguida, prossiga com a extração Elua os ácidos nucleicos em **100 µL** de tampão de eluição.

Outras amostras:

Não existem dados disponíveis relativos aos desempenhos do produto com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: Zaragatoa bucal, líquido amniótico, lavagem broncoalveolar (LBA) e aspirado brônquico (AB), suspensões de leucócitos, suspensões de granulócitos.

Substâncias interferentes

O ADN extraído da amostra não deve conter heparina, hemoglobina, dextran, Ficoll®, etanol ou 2-propanol para evitar problemas de inibição e a possibilidade de resultados inválidos frequentes.

Uma elevada quantidade de ADN genómico humano no ADN extraído da amostra pode inibir a reação de amplificação.

Não existem dados disponíveis relativos a uma inibição causada por fármacos antivirais, antibióticos, quimioterapêuticos ou imunossupressores.

Controlos de amplificação

É absolutamente obrigatório validar cada sessão de amplificação com uma reação de controlo negativo e uma reação de controlo positivo.

Para o Negative Control, utilize água de qualidade para biologia molecular (não fornecida com este kit).

Para o controlo positivo, utilize o produto «**Controlo positivo CMV - ELiTe**» ou o produto «**CMV ELiTe Standard**».

Controlos da qualidade

Recomenda-se a validação de todo o procedimento de análise de cada sessão de extração e amplificação através de testes a Controlos do processo, isto é, uma amostra testada negativa e uma amostra testada positiva ou um material de referência calibrado.

Os controlos externos devem ser usados em conformidade com as organizações de acreditação locais, estatais e federais, consoante aplicável. Um exemplo de controlos externos disponíveis no mercado é o "Painel Q Molecular CMV" (ref. CMVMQP01 da Qnostics Ltd, RU).

PROCEDIMENTO

Definição da sessão de amplificação em tempo real

(Para realizar na área de amplificação/deteção de produtos de amplificação)

Quando é usado um instrumento **7300 Real-Time PCR System**.

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

- ligar o ciclo térmico em tempo real, ligar o computador, executar o software dedicado e abrir uma sessão "quantificação absoluta";
- definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda CMV com o "dispositivo de relatório" = "FAM" e o "disposição de extinção" = "nenhum " (não fluorescente) " e dar-lhe o nome "CMV";
- definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda de controlo interno com o "dispositivo de relatório" = "VIC" (AP525 é semelhante ao VIC) e o "disposição de extinção" = "nenhum " (não fluorescente) " e dar-lhe o nome "CI";
- para cada furo em utilização na microplaca, defina (Inspetor do furo) o "detetor" (tipo de fluorescência a ser medida), a "referência passiva" = "ROX" (é usado AP593 em vez de ROX, normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (amostra, controlo de amplificação negativo, controlo de amplificação positivo ou padrão de quantidade conhecido). Adicione esta informação à **Ficha de trabalho** anexada no final deste manual ou imprima a preparação da microplaca. A **Ficha de trabalho** deve ser atentamente seguida durante a transferência da mistura de reação e das amostras para os furos.

Nota: Para determinar o título ADN na amostra inicial, prepare uma série de reações com o **Q - PCR Standards** (105 gEq, 104 gEq, 103 gEq, 102 gEq) para obter a **curva padrão**.

Veja a seguir, a título de exemplo, como pode organizar as análises quantitativas de 12 amostras.

S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
N.F.	102	103	104	105							

Legenda: S1 - S12: Amostras a serem analisadas; NC: Controlo negativo da amplificação; 102: 102 gEq standard; 103: 103 gEq standard; 104: 104 gEq standard; 105: 105 gEq standard.

Com consulta da documentação do instrumento, definida no software dedicado (Instrumento > Protocolo de ciclo térmico > Perfil térmico) os parâmetros do **ciclo térmico:**

- adicione à fase de amplificação o passo (Adicionar passo) de **extensão a 72 °C**;

Nota: a aquisição de fluorescência (Instrumento > Protocolo do ciclo térmico > Definições > Recolha de dados) deve ser definida durante o passo de hibridização a 60 °C.

- modifique o tempo como indicado na tabela "**Ciclo térmico**";

- defina o número de ciclos para **45**;

- defina o volume para a emulação de software de transferência térmica para a reação ("Volume da amostra") para **30 µL**;

- opcional: adicione a fase de dissociação (Adicionar fase de dissociação) e defina a temperatura de **40 °C a 80 °C**.

Ciclo térmico		
Fase	Temperaturas	Tempo
Descontaminação	50 °C	2 min.
Desnaturação inicial	94 °C	2 min.
Amplificação e deteção (45 ciclos)	94 °C	10 seg.
	60 °C (aquisição de fluorescência)	30 seg.
	72 °C	20 seg.
Dissociação (opcional)	95 °C	15 seg.
	40 °C	30 seg.
	80 °C	15 seg.

Quando é usado um **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**.

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

- ligar o ciclo térmico em tempo real, ligar o computador, executar o software dedicado e abrir uma sessão "quantificação absoluta", bem como definir o "Modo de execução: Rápido 7500";
- definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda CMV com o "dispositivo de relatório" = "FAM" e o "disposição de extinção" = "nenhum " (não fluorescente) " e dar-lhe o nome "CMV";
- definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda de controlo interno com o "dispositivo de relatório" = "VIC" (AP525 é semelhante ao VIC) e o "disposição de extinção" = "nenhum " (não fluorescente) " e dar-lhe o nome "CI";
- para cada furo em utilização na microplaca, defina (Inspetor do furo) o "detetor" (tipo de fluorescência a ser medida), a "referência passiva" = "Cy5" (é usado AP593 em vez de Cy5, para a normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (amostra, controlo de amplificação negativo, controlo de amplificação positivo ou padrão de quantidade conhecido). Adicione esta informação à **Ficha de trabalho** anexada no final deste manual ou imprima a preparação da microplaca. A **Ficha de trabalho** deve ser atentamente seguida durante a transferência da mistura de reação e das amostras para os furos.

Nota: Para determinar o título ADN na amostra inicial, prepare uma série de reações com o **Q - PCR Standards** (105 gEq, 104 gEq, 103 gEq, 102 gEq) para obter a **curva padrão**.

A preparação da análise quantitativa de 12 amostras é mostrada, a título de exemplo, no parágrafo anterior a descrever o procedimento para o instrumento **Sistema de PCR em tempo real 7300**.

Com consulta da documentação do instrumento, definida no software dedicado (Instrumento > Protocolo de ciclo térmico > Perfil térmico) os parâmetros do **ciclo térmico:**

- adicione à fase de amplificação o passo (Adicionar passo) de **extensão a 72 °C**;

Nota: a aquisição de fluorescência (Instrumento > Protocolo do ciclo térmico > Definições > Recolha de dados) deve ser definida durante o passo de hibridização a 60 °C.

- modifique o tempo como indicado na tabela "**Ciclo térmico**";

- defina o número de ciclos para **45**;

- defina o volume para a emulação de software de transferência térmica para a reação ("Volume da amostra") para **30 µL**;

- opcional: adicione a fase de dissociação (Adicionar fase de dissociação) e defina a temperatura de **40 °C a 80 °C**.

Ciclo térmico		
Fase	Temperaturas	Tempo
Descontaminação	50 °C	2 min.
Desnaturação inicial	94 °C	2 min.

Ciclo térmico		
Amplificação e detecção (45 ciclos)	94 °C	10 seg.
	60 °C (aquisição de fluorescência)	30 seg.
	72 °C	20 seg.
Dissociação (opcional)	95 °C	15 seg.
	40 °C	1 min.
	80 °C	15 seg.
	60 °C	15 seg.

Preparação da amplificação

(A ser realizado na área de extração/preparação da reação de amplificação)

Antes de iniciar a sessão, é necessário:

- descongelar os tubos que contêm as amostras a serem analisadas. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo;
- descongelar os tubos da **Mistura CMV Q - PCR** necessários para a sessão, sem esquecer que cada tubo é suficiente para a preparação de **25 reações**. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo;
- descongele os tubos do **CMV Q - PCR Standard**. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo;
- pegue na **microplaca da amplificação** que será usada durante a sessão, tendo cuidado para manusear a mesma com luvas sem pó e para não danificar os furos.

- Com a pipeta, introduza exatamente **20 µL** da **Mistura CMV Q - PCR** no fundo dos furos da **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Evite a criação de bolhas.

Nota: Se não usar a totalidade da mistura de reação, guarde o volume restante num local escuro a -20 °C durante um período máximo de um mês. Congele e descongele a mistura de reação até um máximo de **5 VEZES**.

- Com a pipeta, introduza exatamente, colocando na mistura de reação, **20 µL** de **ADN extraído** da primeira amostra no furo correspondente da **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem a amostra introduzindo com a pipeta o **ADN extraído** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma com as outras amostras de **ADN extraído**.

- Com a pipeta, introduza exatamente, colocando na mistura de reação, **20 µL** de **água de qualidade para biologia molecular** (não fornecida com este produto) no furo da **microplaca da amplificação** do controlo negativo da amplificação, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o controlo negativo introduzindo com a pipeta a **água de qualidade para biologia molecular** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.

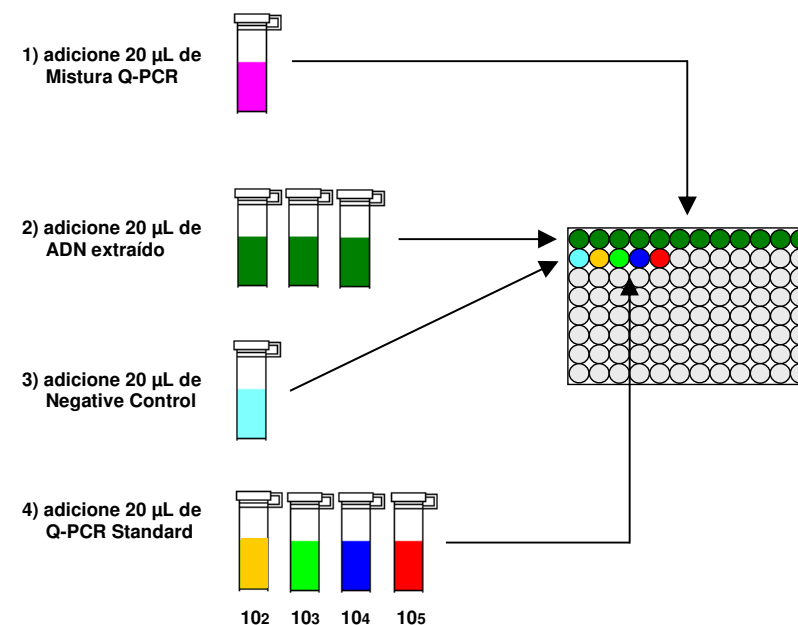
- Com a pipeta, introduza exatamente, colocando na mistura de reação, **20 µL** de **CMV Q - PCR Standard 102** no furo correspondente da **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o padrão introduzindo com a pipeta o **CMV Q - PCR Standard 102** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma com os outros **CMV Q - PCR Standards (103, 104, 105)**.

- Vede com precisão a **microplaca da amplificação** com recurso à **folha vedante da amplificação**.

- Transfira a **microplaca da amplificação** para o ciclo térmico em tempo real na área de amplificação/detecção de produtos de amplificação e inicie o ciclo térmico para a amplificação guardando a definição da sessão com um nome de ficheiro inequívoco e reconhecível (por ex., "anô-mês-dia-CMV-EGSpA").

Nota: No final do ciclo térmico a **microplaca da amplificação** com os produtos de reação devem ser removidos do instrumento e eliminados sem produzir contaminações ambientais. Para evitar derramar os produtos de reação, a **folha vedante da amplificação não deve ser removida da microplaca da amplificação**.

A figura seguinte mostra resumidamente a preparação da reação de amplificação.



Nota: se a preparação da amplificação for realizada com o instrumento «**QIASymphony® SP/AS**», introduza a microplaca que contém os extratos, os reagentes e a microplaca de amplificação nas ranhuras dedicadas, utilizando os adaptadores especiais; em seguida, siga as indicações no manual de instruções de utilização do módulo de configuração e os passos exigidos pelo software.

Nota: se a preparação da reação de amplificação for realizada com o instrumento «**ELITE GALAXY**», carregue a microplaca de eluição, a mistura de Q-PCR e a microplaca de amplificação tal como indicado no manual do utilizador do instrumento e seguindo os passos exigidos pela GUI.

Análise qualitativa dos resultados

Os valores registados da fluorescência emitida pela sonda específica do CMV (detetor FAM "CMV") e pela sonda específica do Controlo Interno (detetor VIC "CI") nas reações de amplificação devem ser analisados pelo software do instrumento.

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

- definir manualmente (Resultados > Lote da amplificação > delta Rn vs Ciclo) o intervalo de cálculo para a **Linha de base** (nível de fundo de fluorescência) do ciclo 6 ao ciclo 15;

Nota: No caso de uma amostra positiva com um elevado título de ADN de CMV, a fluorescência FAM da sonda específica do CMV pode começar a aumentar antes do ciclo 15. Neste caso, o intervalo de cálculo para a **Linha de base** deve ser adaptada desde o ciclo 6 até ao ciclo em que a fluorescência FAM da amostra começa a aumentar, como detetado pelo software do instrumento (Resultados > Componente).

Quando é usado um instrumento **Sistema de PCR em tempo real 7300**:

- defina manualmente o **Limiar** para o detetor FAM "CMV" para **0,1**;
- defina manualmente o **Limiar** para o detetor VIC "CI" para **0,05**.

Quando é usado um **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**:

- defina manualmente o **Limiar** para o detetor FAM "CMV" para **0,2**;
- defina manualmente o **Limiar** para o detetor VIC "CI" para **0,1**.

Os valores de fluorescência emitidos pelas sondas específicas na reação de amplificação e o valor

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

do **Limiar** de fluorescência permitem determinar o **Ciclo do limiar (Ct)**, o ciclo em que a fluorescência alcançou o valor do **Limiar**.

Nas reações de amplificação dos quatro **Q - PCR Standard**, os valores de **Ct** do CMV permitem calcular a **Curva Standard** (Resultados > Curva Standard) da sessão de amplificação e validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Q - PCR Standard 10s Detetor de reação FAM "CMV"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETO

Detetor FAM "CMV" da curva standard	Intervalo de aceitação	Amplificação/deteção
Coefficiente de correlação (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação de **Q - PCR Standard 10s** for **Ct > 25** ou **Ct não determinado** ou se o valor do **Coefficiente de correlação (R2)** não se encontrar dentro dos limites do intervalo de aceitação, o ADN alvo não foi corretamente detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação ou deteção (distribuição incorreta da mistura de reação ou dos standards, degradação da mistura de reação ou dos standards, definição incorreta da posição do standard, definição incorreta do ciclo térmico) que podem originar resultados incorretos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

Na reação de amplificação **Controlo negativo**, o valor de **Ct** do CMV (Resultados > Relatório) é usado para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Detetor de reação de controlo negativo FAM "CMV"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct não determinado	NEGATIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação para o **Controlo negativo** for diferente de **Ct não determinado (não determinado)** para CMV, o ADN alvo foi detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação (contaminação), que podem originar resultados incorretos e falsos positivos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

Na reação de amplificação de cada **amostra**, o valor de **Ct** do CMV é usado para determinar o ADN alvo, enquanto o valor de **Ct** do Controlo Interno é usado para validar a extração, amplificação e deteção.

Nota: Verifique com o software do instrumento (Resultados > Lote de amplificação > delta Rn vs Ciclo) que o **Ct** foi determinado por um aumento rápido e regular dos valores de fluorescência e não por picos ou um aumento do fundo (fundo irregular ou alto).

Este produto é capaz de detetar uma quantidade mínima de cerca de 10 Equivalentes do genoma na reação de amplificação (Ver Características de desempenho).

Os resultados como **Ct** das reações de amplificação de cada **amostra** (Resultados > Relatório) são usados como descrito na tabela seguinte:

Reação da amostra		Adequação da amostra	Resultado do ensaio	ADN de CMV
detetor FAM "CMV"	detetor VIC "IC"			
Ct não determinado	Ct > 35 ou Ct não determinado	inadequado	inválido	-
	Ct ≤ 35	adequado	válido, negativo	NÃO DETETADO
Ct determinado	Ct > 35 ou Ct não determinado	adequado	válido, positivo	DETETADO
	Ct ≤ 35	adequado	válido, positivo	DETETADO

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct não determinado** para o CMV e

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

Ct > 35 ou **Ct não determinado** para o Controlo interno, significa que foi impossível detetar eficientemente o ADN para o Controlo interno. Neste caso, ocorreram problemas durante o passo de amplificação (amplificação ineficiente ou inexistente) ou durante o passo de extração (degradação do ADN da amostra, amostra com um número de células demasiado baixo, perda de ADN durante a extração ou presença de inibidores no ADN extraído) que podem originar resultados incorretos e falsos negativos. A amostra não é adequada, o ensaio é inválido e precisa ser repetido, começando pela extração de uma nova amostra.

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct não determinado** para o CMV e **Ct ≤ 35** para o Controlo Interno, significa que o ADN do CMV não é detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode excluir-se o facto de o ADN do CMV 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 ensaio devem ser interpretados tendo em conta todos os dados clínicos e os outros resultados de testes laboratoriais relativos ao doente.

Nota: Quando o ADN do CMV é detetado na reação de amplificação de uma amostra, o Controlo Interno pode resultar em **Ct > 35** ou **Ct não determinado**. Na realidade, a reação de amplificação de baixa eficiência para o Controlo Interno pode ser deslocada por concorrência com a reação de amplificação de elevada eficiência para o ADN do CMV. Neste caso, a amostra é contudo adequada e o resultado positivo do ensaio é válido.

Análise quantitativa dos resultados

Após a realização do procedimento de análise qualitativa dos resultados, é possível realizar a análise quantitativa dos resultados das amostras positivas.

Os valores de **Ct** do CMV nas reações de amplificação de cada **amostra** e a **Curva standard** (Resultados > Curva standard) da sessão de amplificação são usados para calcular a **Quantidade** de ADN alvo presente nas reações de amplificação das amostras.

Este produto é capaz de quantificar desde cerca de 1.000.000 até cerca de 10 Equivalentes do genoma por reação de amplificação (Ver Características de desempenho).

Sample result detector FAM "CMV"	Equivalentes do genoma CMV por reação
Quantidade > 1 x 10 ⁶	MAIS DE 1.000.000
1 x 10 ¹ ≤ Quantidade ≤ 1 x 10 ⁶	= Quantidade
Quantidade < 1 x 10 ¹	MENOS DE 10

Os resultados (**Quantidade**) de cada **amostra** (Resultados > Relatório) são usados para calcular os equivalentes do genoma (**gEq**) do CMV presente na amostra usada na extração (**Nc**) de acordo com esta fórmula:

$$Nc = \frac{Ve \times Quantidade}{Vc \times Va \times Ep}$$

Onde:

Vc é a quantidade da amostra usada na extração relativamente à unidade de medição exigida;
Ep é a eficiência do procedimento, extração e amplificação, **expressa em decimais**;
Ve é o volume total do produto de extração **expresso em µL**;
Va é o volume do produto de extração usado na reação de amplificação **expresso em µL**;
Quantidade é o resultado da reação de amplificação da amostra **expressa em gEq por reação**.

Quando forem usadas amostras de sangue total colhido em EDTA e o kit de extração «EXTRAblood» e for necessário fornecer o resultado em **gEq/mL**, a fórmula passa a ser:

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = 25 \times \text{Quantidade}$$

Quando forem usadas amostras de sangue total e plasma colhidos em EDTA e o **ELITE STAR** e for necessário fornecer o resultado em **gEq/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para sangue total e plasma e o ELITE STAR

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = 28 \times \text{Quantidade}$$

Quando forem usadas amostras de sangue total e plasma colhidos em EDTA e o **ELITE GALAXY** e for necessário fornecer o resultado em **gEq/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para sangue total e plasma e o ELITE GALAXY

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = 35 \times \text{Quantidade}$$

Quando forem usadas amostras de sangue total colhido em EDTA e o sistema de extração «**NucliSENS® easyMAG®**» e for necessário fornecer o resultado em **gEq/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para sangue total e «NucliSENS® easyMAG®»

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = 50 \times \text{Quantidade}$$

Quando forem usadas amostras de líquido cefalorraquidiano e urina e o sistema de extração «**NucliSENS® easyMAG®**» e for necessário fornecer o resultado em **gEq/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para líquido cefalorraquidiano e urina e «NucliSENS® easyMAG®»

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = 10 \times \text{Quantidade}$$

Quando forem usadas amostras de sangue total colhido em EDTA e o sistema de extração «**QIASymphony® SP/AS**» e for necessário fornecer o resultado em **gEq/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para sangue total e «QIASymphony® SP/AS»

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = 24 \times \text{Quantidade}$$

Quando forem usadas amostras de plasma colhido em EDTA e o sistema de extração «**QIASymphony® SP/AS**» e for necessário fornecer o resultado em **gEq/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para plasma e «QIASymphony® SP/AS»

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = 12 \times \text{Quantidade}$$

Conversão dos resultados para unidades internacionais

Quando forem usadas amostras de sangue total colhido em EDTA e o kit de extração «**EXTRAblood**» e for necessário fornecer o resultado em **IU/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para sangue total e «EXTRAblood»

$$Fc = 0,76 \text{ IU/gEq}$$

$$Nc \text{ (IU/mL)} = Nc \text{ (gEq/mL)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (IU/mL)} = 19,0 \times \text{Quantidade}$$

Quando forem usadas amostras de sangue total colhido em EDTA e o **ELITE STAR** e for necessário fornecer o resultado em **IU/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para sangue total e o ELITE STAR

$$Fc = 0,79 \text{ IU/gEq}$$

$$Nc \text{ (IU/mL)} = Nc \text{ (gEq/mL)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (IU/mL)} = 22,1 \times \text{Quantidade}$$

Quando forem usadas amostras de plasma colhido em EDTA e o **ELITE STAR** e for necessário fornecer o resultado em **IU/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para plasma e ELITE STAR

$$Fc = 1,10 \text{ IU/gEq}$$

$$Nc \text{ (IU/mL)} = Nc \text{ (gEq/mL)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (IU/mL)} = 30,8 \times \text{Quantidade}$$

Quando forem usadas amostras de sangue total colhido em EDTA e o **ELITE GALAXY** e for necessário fornecer o resultado em **IU/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para sangue total e o ELITE GALAXY

$$Fc = 0,51 \text{ IU/gEq}$$

$$Nc \text{ (IU/mL)} = Nc \text{ (gEq/mL)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (IU/mL)} = 17,9 \times \text{Quantidade}$$

Quando forem usadas amostras de plasma colhido em EDTA e o **ELITE GALAXY** e for necessário fornecer o resultado em **IU/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para plasma e ELITE GALAXY

$$Fc = 0,27 \text{ IU/gEq}$$

$$Nc \text{ (IU/mL)} = Nc \text{ (gEq/mL)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (IU/mL)} = 9,5 \times \text{Quantidade}$$

Quando forem usadas amostras de sangue total colhido em EDTA e o sistema de extração «**NucliSENS® easyMAG®**» e for necessário fornecer o resultado em **IU/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para sangue total e «NucliSENS® easyMAG®»

$$Fc = 0,61 \text{ IU/gEq}$$

$$Nc \text{ (IU/mL)} = Nc \text{ (gEq/mL)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (IU/mL)} = 30,5 \times \text{Quantidade}$$

Quando forem usadas amostras de sangue total colhido em EDTA e o sistema de extração «**QIASymphony® SP/AS**» e for necessário fornecer o resultado em **IU/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para sangue total e «QIASymphony® SP/AS»

$$Fc = 0,46 \text{ IU/gEq}$$

$$Nc \text{ (IU/mL)} = Nc \text{ (gEq/mL)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (IU/mL)} = 11,0 \times \text{Quantidade}$$

Quando forem usadas amostras de plasma colhido em EDTA e o sistema de extração «**QIASymphony® SP/AS**» e for necessário fornecer o resultado em **IU/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para plasma e «QIASymphony® SP/AS»

$$Fc = 0,87 \text{ IU/gEq}$$

$$Nc \text{ (IU/mL)} = Nc \text{ (gEq/mL)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (IU/mL)} = 10,4 \times \text{Quantidade}$$

Onde **Fc** for o fator de conversão calculado utilizando o material de referência calibrado aprovado pela OMS "1.ª Norma internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico (NAT)", NIBSC código 09/162, Reino Unido (ver o parágrafo Características de desempenho).

CMV ELiTe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade analítica: limite de deteção

A sensibilidade analítica deste ensaio, como limite de deteção, permite a deteção da presença de cerca de 11 cópias em 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A sensibilidade analítica deste ensaio, como limite de deteção, foi testado usando o ADN plasmídico que contém o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. O ADN plasmídico foi diluído a um título de 10 cópias/20 µL no ADN genómico humano a um título de 500 ng/20 µL. Esta amostra foi testada em 50 réplicas a realizarem a amplificação por produtos ELITechGroup S.p.A.. Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
10 cópias de ADN plasmídico + 500 ng de ADN genómico humano	50	50	0

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de sangue total e o «EXTRAblood» foi verificada com um painel de diluições de CMV dentro da concentração limite. O painel foi preparado utilizando amostras de sangue total negativas para ADN de CMV, reforçadas com material de referência calibrado e certificado OptiQuant CMV DNA (estirpe AD169, AcroMetrix Europe B.V., Países Baixos). As concentrações virais variaram de 1 gEq/mL a 3.160 gEq/mL. Cada amostra do painel foi testada em 24 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação por produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

Os resultados finais são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de sangue total e «EXTRAblood» (gEq/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	279 gEq/mL	198 gEq/mL	466 gEq/mL

Limite de deteção para amostras de sangue total e «EXTRAblood» (gEq/reação)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	11,2 gEq/reação	7,9 gEq/reação	18,6 gEq/reação

A conversão de gEq/mL para gEq/reação foi calculada como mostrado na página 38.

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de sangue total e o ELiTe STAR foi verificada com um painel de diluições de CMV dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da "1.ª" norma internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/162, Reino Unido) em ADN CMV - sangue total EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 3,160 IU/mL a 1000 IU/mL. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração automática com ELiTe STAR e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%. Os resultados finais são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de sangue total e ELiTe STAR (IU/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	263 IU/mL	128 IU/mL	1.208 IU/mL

A sensibilidade analítica como gEq/mL está reportada a seguir:

Limite de deteção para amostras de sangue total e ELiTe STAR (gEq/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	332 gEq/mL	162 gEq/mL	1.529 gEq/mL

CMV ELiTe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

A sensibilidade analítica como gEq/mL para amostras de sangue total e o ELiTe STAR é calculada através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 38.

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de plasma e o ELiTe STAR foi verificada com um painel de diluições de CMV dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da "1.ª" norma internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/162, Reino Unido) em ADN CMV - plasma EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 3,160 IU/mL a 1000 IU/mL. Cada amostra do painel foi testada em 8 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração automática com ELiTe STAR e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

Os resultados finais são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de plasma e ELiTe STAR (IU/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	222 IU/mL	126 IU/mL	1.638 IU/mL

A sensibilidade analítica como gEq/mL está reportada a seguir:

Limite de deteção para amostras de plasma e ELiTe STAR (gEq/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	201 gEq/mL	114 gEq/mL	1.489 gEq/mL

A sensibilidade analítica como gEq/mL para amostras de plasma e o ELiTe STAR é calculada através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 38.

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de sangue total e o ELiTe GALAXY foi verificada com um painel de diluições de CMV dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da "1.ª" norma internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/162, Reino Unido) em ADN CMV - sangue total EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 10 IU/mL a 560 IU/mL. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração e Configuração PCR com o ELiTe GALAXY e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

Os resultados finais são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de sangue total e ELiTe GALAXY (IU/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	127 IU/mL	75 IU/mL	435 IU/mL

A sensibilidade analítica como gEq/mL está reportada a seguir

Limite de deteção para amostras de sangue total e ELiTe GALAXY (gEq/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	249 gEq/mL	147 gEq/mL	853 gEq/mL

A sensibilidade analítica como gEq/mL para amostras de sangue total e o ELiTe GALAXY é calculada através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 38.

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de plasma e o ELiTe GALAXY foi verificada com um painel de diluições de CMV dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da "1.ª" norma internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/162, Reino Unido) em ADN CMV - plasma EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 10 IU/mL a 560 IU/mL. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração e Configuração

CMV ELITE MGB® Kit reagente para amplificação em tempo real do ADN
--

REF RTK015PLD

PCR com o **ELITE GALAXY** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de detecção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

Os resultados finais são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de detecção para amostras de plasma e ELITE GALAXY (IU/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	140 IU/mL	86 IU/mL	381 IU/mL

A sensibilidade analítica como gEq/mL está reportada a seguir

Limite de detecção para amostras de plasma e ELITE GALAXY (gEq/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	519 gEq/mL	319 gEq/mL	1.411 gEq/mL

A sensibilidade analítica como gEq/mL para amostras de plasma e o **ELITE GALAXY** é calculada através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 38.

Sensibilidade analítica: intervalo de medição linear

A sensibilidade analítica deste ensaio, como intervalo de medição linear, permite a quantificação desde cerca de 1.000.000 até cerca de 10 Equivalentes do genoma em 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A sensibilidade analítica deste ensaio foi determinada usando um painel de diluições (passos de diluição de 1 registo₁₀) de ADN de plasmídeo contendo o produto de amplificação, cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. As diluições de 2,5 x 10⁷ Equivalentes do genoma por reação a 2,5 x 10¹ Equivalentes do genoma por reação foram testadas em 9 réplicas através da realização da amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise dos dados obtidos, realizada por regressão linear, demonstrou que o ensaio mostra uma resposta linear para todas as diluições (coeficiente de correlação quadrado superior a 0,99).

O limite inferior do intervalo de medição linear deste ensaio usado em associação com amostras de sangue total e o «**EXTRAblood**» foi definido a cerca de 13 gEq/reação, porque 316 gEq/mL é a concentração mais baixa que fornece 100% de positividade no estudo do limite de detecção. O limite inferior do intervalo de medição linear encontra-se dentro de 1 algoritmo desde a concentração mais baixa do standard de amplificação Q - PCR Standard (102 gEq/20 µL).

O limite superior do intervalo de medição linear deste ensaio usado em associação com amostras de sangue total e o «**EXTRAblood**» foi definido a 10⁹ gEq/reação, dentro de 1 algoritmo desde a concentração mais alta do standard de amplificação Q - PCR Standard (105 gEq/20 µL). Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear para amostras de sangue total e o «EXTRAblood»		
	limite inferior	limite superior
IU/mL	240	19.000.000
gEq/mL	316	25.000.000
gEq/reação	12,6	1.000.000

A conversão de gEq/mL para gEq/reação e vice-versa foi calculada como mostrado na página 38. A conversão de gEq/mL para IU/mL e vice-versa foi calculada como mostrado na página 39.

O limite inferior do intervalo de medição linear deste ensaio usado em associação com amostras de sangue total e o **ELITE GALAXY** foi definido a cerca de 10 gEq/reação, porque 350 gEq/mL é a concentração mais baixa que fornece 100% de positividade no estudo do limite de detecção. O limite inferior do intervalo de medição linear encontra-se dentro de 1 algoritmo desde a concentração mais baixa do standard de amplificação Q - PCR Standard (102 gEq/20 µL).

O limite superior do intervalo de medição linear deste ensaio usado em associação com amostras de sangue total e o **ELITE GALAXY** foi definido a 10⁹ gEq/reação, dentro de 1 algoritmo desde a concentração mais alta do standard de amplificação Q - PCR Standard (105 gEq/20 µL). Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

CMV ELITE MGB® Kit reagente para amplificação em tempo real do ADN
--

REF RTK015PLD

Intervalo de medição linear para amostras de sangue total e o ELITE GALAXY		
	limite inferior	limite superior
IU/mL	178	17.800.000
gEq/mL	350	35.000.000
gEq/reação	10	1.000.000

A conversão de gEq/mL para gEq/reação e vice-versa foi calculada como mostrado na página 38. A conversão de gEq/mL para IU/mL e vice-versa foi calculada como mostrado na página 39.

Sensibilidade analítica: Precisão e exatidão

A precisão do ensaio, enquanto variabilidade dos resultados obtidos com várias réplicas de uma amostra testada dentro da mesma sessão, permitiu obter uma percentagem média do Coeficiente de variação (% CV) de Ct inferior a 2%, dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas nos 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A precisão do ensaio, enquanto variabilidade dos resultados obtidos com várias réplicas de uma amostra testada dentro da mesma sessão, permitiu obter uma percentagem média do Coeficiente de variação (% CV) de cerca de 21% das quantidades medidas, dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas nos 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A precisão do ensaio, enquanto diferença entre a média dos resultados obtidos com várias réplicas de uma amostra dentro da mesma sessão e a concentração teórica da amostra, permitiu obter uma percentagem média de Imprecisão (% Imprec.) de cerca de 20% das quantidades medidas, dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas nos 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A precisão e a exatidão foram calculadas utilizando dados obtidos para o estudo do intervalo de medição linear.

Sensibilidade analítica: capacidade de reprodução com material de referência certificado

A sensibilidade analítica do ensaio, como capacidade de reprodução dos resultados comparada com os resultados obtidos com recurso a outros ensaios em diferentes laboratórios, foi verificada através de testes a um painel de material de referência certificado.

Os testes foram realizados utilizando como material de referência calibrado e certificado um painel de diluições de CMV dentro da concentração limite (estirpe AD169, Painel EQA do ADN do Citomegalovírus humano QCMD 2009, Qnostics Ltd, Escócia, RU). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração manual com «**EXTRAblood**» e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com material de referência certificado e «EXTRAblood»				
Amostra	Consenso Vírus Registo ₁₀ conc.	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios gEq/mL Registo ₁₀
CMV09-01	4,368	0,465	2 / 2	4,064
CMV09-02	2,995	0,400	2 / 2	2,984
CMV09-03	2,297	0,583	2 / 2	2,038
CMV09-04	5,407	0,442	2 / 2	5,026
CMV09-05	2,996	0,444	2 / 2	2,902
CMV09-06	3,493	0,421	2 / 2	3,231
CMV09-07	4,379	0,412	2 / 2	4,129
CMV09-08	negativo	N/A	0 / 2	Não detetado
CMV09-09	6,374	0,457	2 / 2	5,943
CMV09-10	2,352	0,542	2 / 2	1,996
CMV09-11	2,407	0,513	2 / 2	2,105
CMV09-12	3,645	0,449	2 / 2	3,539

Todas as amostras foram detetadas corretamente. Os resultados quantitativos obtidos estão dentro do intervalo definido pelo ensaio comercial SD ± 1 do Consenso, conforme necessário.

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência calibrado um painel de diluições de CMV dentro do limite de concentração ("Painel EQA do ADN do Citomegalovírus humano

CMV ELiTe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

QCMD 2012, Qnostics Ltd, Escócia, RU). Cada amostra foi testada em duplicados através da realização de todo o procedimento de análise: extração com **ELiTe STAR** e amplificação com produtos ELiTechGroup S.p.A.

Os resultados em IU/mL foram calculados através da aplicação do fator de conversão para o **ELiTe STAR** e plasma e são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o ELiTe STAR				
Amostra	Consenso Vírus Registo ₁₀ conc.	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios Log ₁₀ IU / mL
CMV12-01	4,409	0,349	2/2	4,580
CMV12-02	3,925	0,335	2/2	4,111
CMV12-03	2,297	0,507	1/2	2,423
CMV12-04	2,021	0,617	1/2	2,320
CMV12-05	3,158	0,613	2/2	3,529
CMV12-06	3,448	0,361	2/2	3,594
CMV12-07	3,490	0,377	2/2	3,321
CMV12-08	Negativo	N/A	0/2	Não detetado
CMV12-09	3,767	0,374	2/2	4,580
CMV12-10	2,826	0,456	1/2	4,111

Todas as amostras foram detetadas corretamente. Os resultados quantitativos estão dentro do intervalo definido pelo SD ± 1 do Consenso.

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência calibrado um painel de diluições de CMV dentro do limite de concentração ("Painel EQA do ADN do Citomegalovírus humano QCMD 2012, Qnostics Ltd, RU). Cada amostra foi testada em duplicados através da realização de todo o procedimento de análise: extração e Configuração PCR com o **ELiTe GALAXY** e amplificação com produtos ELiTechGroup S.p.A.

Os resultados em IU/mL foram calculados através da aplicação do fator de conversão para o **ELiTe GALAXY** e plasma e são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o ELiTe GALAXY				
Amostra	Consenso Vírus Registo ₁₀ conc.	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios Log ₁₀ IU / mL
CMV12-01	4,409	0,349	2/2	4,010
CMV12-02	3,925	0,335	2/2	3,484
CMV12-03	2,297	0,507	1/1	1,811
CMV12-04	2,021	0,617	2/2	1,647
CMV12-05	3,158	0,613	2/2	2,511
CMV12-06	3,448	0,361	2/2	3,106
CMV12-07	3,490	0,377	2/2	3,319
CMV12-08	Negativo	N/A	0/2	Não detetado
CMV12-09	3,767	0,374	2/2	3,486
CMV12-10	2,826	0,456	2/2	2,593

Uma réplica do CMV12-03 foi excluída da análise devido a falha do sistema durante o passo de extração inicial. Na análise qualitativa, todas as amostras foram corretamente detetadas. Na análise quantitativa, 8/9 amostras positivas foram corretamente quantificadas dentro da diferença de registo de 0,5 do título esperado. As amostras CMV12-01 e CMV12-07 são amostras emparelhadas. A diferença entre CMV12-01 (4,035 Registo₁₀) e CMV12-07 (3,296 Registo₁₀) teve um resultado igual a 0,691 e encontra-se dentro do intervalo esperado. O resultado CMV12-07 foi considerado válido.

Sensibilidade analítica: Fator de conversão para unidades internacionais

Para converter o resultado quantitativo de gEq/mL para Unidades internacionais/mL, o fator de conversão a ser utilizado com este ensaio e **amostras de sangue total** colhido em EDTA foi definido como:

0,76 Unidades internacionais/gEq quando for usado o kit de extração manual «**EXTRAblood**»;

0,79 Unidades internacionais/gEq quando for usado o sistema de extração automática **ELiTe STAR**;

0,51 Unidades internacionais/gEq quando for usado o sistema de extração automática **ELiTe GALAXY**;

0,61 Unidades internacionais/gEq quando for usado o sistema de extração automática «NucliSENS®

CMV ELiTe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

easyMAG®»;

0,46 Unidades internacionais/gEq quando for usado o sistema de extração automática «QIASymphony® SP/AS»;

Para converter o resultado quantitativo de gEq/mL para Unidades internacionais/mL, o fator de conversão a ser utilizado com este ensaio e **amostras de plasma** colhido em EDTA foi definido como:

1,10 Unidades internacionais/gEq quando for usado o sistema de extração automática **ELiTe STAR**;

0,27 Unidades internacionais/gEq quando for usado o sistema de extração automática **ELiTe GALAXY**;

0,87 Unidades internacionais/gEq quando for usado o sistema de extração automática «QIASymphony® SP/AS».

São comunicados a seguir dados sobre cada fator de conversão.

Sangue total colhido em EDTA

O fator de conversão foi calculado utilizando um painel de quatro diluições (0,5 Registo₁₀ entre diluições) de material de referência calibrado aprovado pela OMS ("1.ª Norma Internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico", NIBSC código 09/162, Reino Unido) em sangue total colhido em EDTA.

Cada ponto do painel foi testado em 8 réplicas através da realização de toda a análise, extração com «**EXTRAblood**» e amplificação, com produtos ELiTechGroup S.p.A.

A análise dos dados obtidos permite calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 0,76 Unidades internacionais (IU) por gEq de CMV detetado.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Conversão para Unidades internacionais com sangue total e «EXTRAblood» (Fc = 0,76 IU/gEq)				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registo ₁₀	Quantidade média gEq/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registo ₁₀
316.255	5,500	362.383	275.411	5,440
100.000	5,000	155.738	118.361	5,073
31.625	4,500	39.503	30.022	4,477
10.000	4,000	13.623	10.353	4,015

Cada ponto do painel foi testado em 15 réplicas através da realização de toda a análise extração com o **ELiTe STAR** e amplificação com produtos ELiTechGroup S.p.A.

A análise dos dados obtidos permite calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 0,79 Unidades internacionais (IU) por gEq de CMV detetado com amostras de sangue total.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Conversão para Unidades internacionais com sangue total e ELiTe STAR (Fc = 0,79 IU/gEq)				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registo ₁₀	Quantidade média gEq/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registo ₁₀
316.255	5,500	566.090	464.398	5,620
100.000	5,000	135.119	106,744	4,997
31.625	4,500	42.655	33.698	4,488
10.000	4,000	14.486	11.444	4,014
3.162	3,500	3.717	2.936	3,401

Cada ponto do painel foi testado em 15 réplicas através da realização de toda a análise, extração e Configuração PCR com o **ELiTe GALAXY** e amplificação com produtos ELiTechGroup S.p.A.

A análise dos dados obtidos permite calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 0,51 Unidades internacionais (IU) por gEq de CMV detetado com amostras de sangue total.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

Conversão para Unidades internacionais com sangue total e ELITE GALAXY (Fc = 0,51 IU/gEq)				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registro ₁₀	Quantidade média gEq/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registro ₁₀
316.255	5,500	473.265	240.507	5,370
100.000	5,000	217.626	110.595	5,036
31.625	4,500	55.656	28.284	4,438
10.000	4,000	24.229	12.313	4,076
3.162	3,500	7.809	3.968	3,575

Cada ponto do painel foi testado em 8 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática «NucliSENS® easyMAG®» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

A análise dos dados obtidos permitiu calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 0,61 Unidades internacionais (IU) por gEq de CMV detetado.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Conversão para Unidades internacionais com sangue total e «NucliSENS® easyMAG®» (Fc = 0,61 IU/gEq)				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registro ₁₀	Quantidade média gEq/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registro ₁₀
316.255	5,500	564.835	344.549	5,537
100.000	5,000	178.704	109.009	5,037
31.625	4,500	51.454	31.387	4,497
10.000	4,000	14.141	8.626	3,936

Cada ponto do painel foi testado em 8 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática «QIASymphony® SP/AS» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

A análise dos dados obtidos permitiu calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 0,46 Unidades internacionais (IU) por gEq de CMV detetado utilizando amostras de sangue total.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Conversão para Unidades internacionais com sangue total e «QIASymphony® SP/AS» (Fc = 0,46 IU/gEq)				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registro ₁₀	Quantidade média gEq/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registro ₁₀
316.255	5,500	599.940	275.972	5,435
100.000	5,000	222.073	102.153	5,004
31.625	4,500	70.712	32.527	4,497
10.000	4,000	24.326	11.190	4,038

Plasma colhido em EDTA

O fator de conversão foi calculado utilizando um painel de quatro diluições (0,5 Registro₁₀ entre diluições) de material de referência calibrado aprovado pela OMS ("1.ª Norma Internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico", NIBSC código 09/162, Reino Unido) em plasma colhido em EDTA.

Cada ponto do painel foi testado em 15 réplicas através da realização de toda a análise extração com o **ELITE STAR** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

A análise dos dados obtidos permite calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 1,10 Unidades internacionais (IU) por gEq de CMV detetado com amostras de plasma.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

Conversão para Unidades internacionais com plasma e ELITE STAR (Fc = 1,10 IU/gEq)				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registro ₁₀	Quantidade média gEq/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registro ₁₀
316.255	5,500	282.851	311.136	5,481
100.000	5,000	107.043	117.747	5,048
31.625	4,500	30.868	33.955	4,512
10.000	4,000	8.632	9.495	3,972
3.162	3,500	2.814	3.096	3,468

Cada ponto do painel foi testado em 15 réplicas através da realização de toda a análise, extração e Configuração PCR com o **ELITE GALAXY** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

A análise dos dados obtidos permite calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 0,27 Unidades internacionais (IU) por gEq de CMV detetado com amostras de plasma.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Conversão para Unidades internacionais com plasma e ELITE GALAXY (Fc = 0,27 IU/gEq)				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registro ₁₀	Quantidade média gEq/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registro ₁₀
316.228	5,500	1.095.881	301.020	5,413
100.000	5,000	460.141	126.393	5,033
31.623	4,500	117.258	32.209	4,448
10.000	4,000	43.980	12.081	4,053
3.162	3,500	13.713	3.767	3,546

Cada ponto do painel foi testado em 8 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática «QIASymphony® SP/AS» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

A análise dos dados obtidos permitiu calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 0,87 Unidades internacionais (IU) por gEq de CMV detetado utilizando amostras de plasma.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Conversão para Unidades internacionais com plasma e «QIASymphony® SP/AS» (Fc = 0,87 IU/gEq)				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registro ₁₀	Quantidade média gEq/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registro ₁₀
316.255	5,500	330.340	287.396	5,458
100.000	5,000	101.683	88.464	4,947
31.625	4,500	40.963	35.638	4,551
10.000	4,000	13.148	11.438	4,058

Sensibilidade de diagnóstico: eficiência de detecção e quantificação em diferentes genótipos/subtipos

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como eficiência de detecção e quantificação em diferentes genótipos/subtipos foi avaliada por comparação de sequências com bases de dados de nucleótidos.

A análise das regiões escolhidas para a hibridização dos primários e da sonda fluorescente no alinhamento das sequências disponíveis na base de dados para o exon4 do gene CMV MIEA, estirpes AD169 e Merlin entre outras, revelou a conservação e ausência de mutações significativas.

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como eficiência de detecção e quantificação em diferentes genótipos/subtipos, foi avaliada utilizando uma construção de plasmídeo contendo a região amplificada do CMV, estirpe Merlin.

A eficiência de detecção e quantificação foi avaliada utilizando como material de referência uma construção de plasmídeo contendo a região amplificada do CMV, estirpe Merlin (GENEART A.G., Alemanha). O ADN de plasmídeo foi diluído para uma concentração de 100.000, 10.000, 1000, 100 e 10 cópias por reação. Cada amostra foi testada através da realização da amplificação por produtos

CMV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

ELITechGroup S.p.A..

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Eficiência de detecção e quantificação na estirpe Merlin do CMV			
Amostra	Concentração teórica cópias/reacção	Positivos/réplicas	Resultados médios cópias/reacção
plasmídeo pMerlin 105	100.000	3 / 3	93.699
plasmídeo pMerlin 104	10.000	3 / 3	8.815
plasmídeo pMerlin 103	1.000	3 / 3	898
plasmídeo pMerlin 102	100	3 / 3	100
plasmídeo pMerlin 101	10	9 / 9	11

O plasmídeo pMerlin foi corretamente detetado e quantificado até à concentração de 10 cópias por reacção.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi testada através da análise de algumas amostras clínicas de sangue total positivas para ADN de CMV.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 54 amostras de sangue total colhido em EDTA positivas para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração manual com «EXTRAblood» e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA positivo para ADN de CMV	54	53	0

Uma amostra teve resultado "não válido" em duas sessões independentes da análise. O resultado "não válido" foi possivelmente causado por um inibidor não identificado na amostra. Esta amostra não foi incluída no cálculo de sensibilidade de diagnóstico.

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi superior a 100%.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 60 amostras de sangue total colhido em EDTA que estavam positivas para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração automática com ELITE STAR e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA e positivo para ADN de CMV	60	57	0

Três amostras tiveram resultado "não válido" em duas sessões independentes da análise.

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 100%.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 68 amostras de plasma colhido em EDTA que estavam positivas para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração automática com ELITE STAR e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Plasma colhido em EDTA positivo para ADN de CMV	68	66	2

Dois amostras comunicaram um resultado negativo com produtos ELITechGroup S.p.A.. Esta discordância pode ser explicada pelo facto de o título de CMV da amostra estar próximo ou ser inferior ao limite de detecção do método utilizado (280 gEq/mL).

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 97,1%.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 60 amostras de sangue total colhido em EDTA que estavam positivas para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração automática e Configuração PCR com o ELITE GALAXY e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

CMV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA e positivo para ADN de CMV	60	59	1

Uma amostra comunicou um resultado negativo com produtos ELITechGroup S.p.A.. Esta discordância pode ser explicada por uma degradação da amostra.

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 98,3%.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 51 amostras de plasma colhido em EDTA que estavam positivas para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração automática e Configuração PCR com o ELITE GALAXY e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Plasma colhido em EDTA positivo para ADN de CMV	51	47	4

Quatro amostras comunicaram um resultado negativo com produtos ELITechGroup S.p.A.. Os títulos das amostras discrepantes (respetivamente <350 gEq/mL, <350 gEq/mL, 961 gEq/mL e 534 gEq/mL) inferiores ao limite de detecção do método utilizado.

Neste teste, a sensibilidade de diagnóstico foi igual a 92,2%.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 50 amostras de sangue total colhido em EDTA de dadores normais, que estavam presumivelmente negativas para ADN de CMV, reforçadas com uma amostra de material de referência calibrado certificado (Painel EQA de ADN de Citomegalovírus humano QCMD 2009, Qnostics Ltd, RU) a um título de 1500 cópias/mL. Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática «NucliSENS® easyMAG®» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA, reforçado com ADN de CMV	50	50	0

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi superior a 100%.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 60 amostras de sangue total colhido em EDTA de dadores normais, que estavam presumivelmente negativas para ADN de CMV, reforçadas com uma amostra de material de referência calibrado certificado (Painel EQA de ADN de Citomegalovírus humano QCMD 2009, Qnostics Ltd, RU) a um título de 700 cópias/mL. Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática «QIASymphony® SP/AS» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA, reforçado com ADN de CMV	60	60	0

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi superior a 100%.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 60 amostras de plasma colhido em EDTA de dadores normais, que estavam presumivelmente negativas para ADN de CMV, reforçadas com uma amostra de material de referência calibrado certificado (Painel EQA de ADN de Citomegalovírus humano QCMD 2009, Qnostics Ltd, RU) a um título de 360 cópias/mL. Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática «QIASymphony® SP/AS» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Plasma colhido em EDTA reforçado com ADN de CMV	60	60	0

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi superior a 100%.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 60 amostras de líquido cefalorraquidiano que estavam negativas para ADN de CMV, testadas positivas com uma amostra de material de referência calibrado certificado (Painel EQA de ADN de Citomegalovírus humano QCMD

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

2009, Qnostics Ltd, RU) que foram reforçadas a um título de 300 cópias/mL. Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática «NucliSENS® easyMAG®» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Líquido cefalorraquidiano reforçado com ADN de CMV	60	60	0

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi superior a 100%.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 52 amostras clínicas de urina positiva para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi usada para a realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática «NucliSENS® easyMAG®» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Urina positiva para ADN de CMV	52	52	0

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi superior a 100%.

Especificidade analítica: ausência de reatividade cruzada com marcadores potencialmente interferentes

A especificidade analítica do ensaio, como ausência de reatividade cruzada com outros marcadores potencialmente interferentes, foi avaliada por comparação de sequências com bases de dados de nucleótidos.

A análise do alinhamento das sequências dos primários e da sonda fluorescente com as sequências disponíveis nas bases de dados para organismos diferentes do CMV, incluindo o genoma completo HHV6, o vírus herpético humano que é o mais semelhante ao CMV, revelou a respetiva especificidade e a ausência de homologia significativa.

A especificidade analítica do ensaio, como ausência de reatividade cruzada com outros marcadores potencialmente interferentes, foi verificada através de testes a algumas amostras clínicas negativas para ADN de CMV que estavam positivas para ADN de HHV6, EBV ou VZV. As amostras foram confirmadas negativas.

A especificidade analítica foi verificada utilizando como material de referência 16 amostras de sangue total colhido em EDTA que estavam negativas para ADN de CMV e positivas para ADN de HHV6, EBV ou VZV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA positivo para ADN de HHV6	8	0	8
Sangue total colhido em EDTA positivo para ADN de EBV	7	0	7
Sangue total colhido em EDTA positivo para ADN de VZV	1	0	1

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi testada através da análise de algumas amostras clínicas de sangue total negativas para ADN de CMV.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 56 amostras de sangue total colhido em EDTA que estavam negativas para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração manual com «EXTRABlood» e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA negativo para ADN de CMV	56	0	56

A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi superior a 100%.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 70 amostras de sangue total colhido em EDTA que estavam negativas para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração automática com **ELITE STAR** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA negativo para ADN de CMV	70	0	63

Sete amostras tiveram resultado "não válido" em duas sessões independentes da análise.

A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 100%.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 61 amostras de plasma colhido em EDTA que estavam negativas para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração automática com **ELITE STAR** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Plasma colhido em EDTA negativo para ADN de CMV	61	0	61

A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 100%.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 66 amostras de sangue total colhido em EDTA que estavam negativas para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração automática e Configuração PCR com o **ELITE GALAXY** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA negativo para ADN de CMV	66	0	65

Uma amostra teve resultado "não válido", possivelmente causado por um inibidor não identificado na amostra. Esta amostra não foi incluída no cálculo de sensibilidade de diagnóstico.

A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 100%.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 64 amostras de plasma colhido em EDTA que estavam negativas para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração automática e Configuração PCR com o **ELITE GALAXY** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Plasma colhido em EDTA negativo para ADN de CMV	64	0	64

A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 100%.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 50 amostras de sangue total colhido em EDTA de doadores normais que estavam presumivelmente negativas para ADN de CMV. Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática «NucliSENS® easyMAG®» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA negativo para CMV	50	0	50

A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi superior a 100%.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 60 amostras de sangue total colhido em EDTA de doadores normais que estavam presumivelmente negativas para ADN de CMV. Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática «QIASymphony® SP/AS» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA negativo para CMV	60	1	59

Uma amostra de sangue negativa para CMV comunicou um resultado positivo para CMV a um título viral muito baixo (aproximadamente 2 gEq/reação), com produtos ELITechGroup S.p.A. Esta discordância pode ser explicada por uma infecção CMV latente, uma vez que o vírus está disseminado na população.

A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 98,3%.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 60 amostras de plasma colhido em EDTA de doadores normais que estavam presumivelmente negativas para ADN de CMV. Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática «QIASymphony® SP/AS» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Plasma colhido em EDTA negativo para CMV	60	1	59

Uma amostra de plasma negativa para CMV comunicou um resultado positivo para CMV a um título viral muito baixo (aproximadamente 2 gEq/reação), com produtos ELITechGroup S.p.A. Esta discordância pode ser explicada por uma infecção CMV latente, uma vez que o vírus está disseminado na população.

A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 98,3%.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 60 amostras de líquido cefalorraquidiano que estavam negativas para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática «NucliSENS® easyMAG®» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Líquido cefalorraquidiano negativo para CMV	60	0	60

A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi superior a 100%.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 56 amostras clínicas de urina negativa para ADN de CMV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi utilizada para a realização de todo o procedimento de análise, extração de ácido nucleico automática pelo «NucliSENS® easyMAG®» e amplificação com produtos do ELITechGroup S.p.A. Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Urina negativa para ADN de CMV	56	1	55

Uma amostra de urina negativa para CMV comunicou um resultado positivo para CMV com produtos ELITechGroup S.p.A. Esta discordância pode ser explicada pelo título viral muito baixo (4 gEq/reação), provavelmente mais baixo que o limite de deteção do método de referência. A especificidade de diagnóstico foi igual a 98,2%.

Robustez: ausência de contaminação cruzada

A robustez do ensaio, enquanto ausência de contaminação cruzada, foi verificada através da análise dos resultados de cinco sessões, em que as amostras negativas para ADN de CMV foram alternadas com amostras reforçadas com ADN de CMV. Nenhuma das amostras negativas para ADN de CMV teve resultado positivo.

A ausência de contaminação cruzada foi verificada com recurso a uma amostras de sangue total negativa para ADN de CMV reforçada com material de referência calibrado e certificado OptiQuant CMV DNA (estirpe AD169, AcroMetrix Europe B.V., Países Baixos) a uma carga viral de 8.300 gEq/mL e uma amostras de sangue total negativa para ADN de CMV. Foram testadas cinco séries de 12 amostras,

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

alternando uma amostra reforçada com uma amostra negativa, através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA reforçado com ADN de CMV	30	30	0
Sangue total colhido em EDTA negativo para ADN de CMV	30	0	30

Robustez: taxa de falha de todo o sistema

A robustez do ensaio, como taxa de falha de todo o sistema que resulta em falsos resultados negativos, foi verificada através da análise de um painel de ADN de CMV reforçado a amostras de título baixo e com resultado inferior a 1,7%.

A taxa de falha de todo o sistema foi verificada utilizando um painel de amostras de sangue total negativas para ADN de CMV reforçadas com material de referência calibrado e certificado OptiQuant CMV DNA (estirpe AD169, AcroMetrix Europe B.V., Países Baixos) a uma carga viral de 900 gEq/mL. Cada amostra do painel foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA reforçado com ADN de CMV	60	60	0

Roche cobas z 480 analyzer

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser utilizado com o **ADN extraído** das seguintes amostras clínicas:

Sangue total colhido em EDTA

As amostras de sangue total para extração de ADN devem ser colhidas em EDTA de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas a +2°/+8 °C e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de três dias, caso contrário, devem ser congeladas e guardadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos. 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: quando realizar a extração de ADN de amostras de sangue total com o instrumento **"MagNA Pure 24 System"** com **software versão 1.0** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **"Pathogen200"** siga estas instruções: distribua **350 µL** da amostra para o tubo de 2,0 mL de MagNA Pure, carregue o tubo no instrumento e inicie a extração. Este protocolo processa 200 µL de amostra, adiciona **CPE** a 20 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL. O **CPE** deve ser diluído 1:2 em água de qualidade para biologia molecular ultra pura. Para obter mais informações sobre o procedimento de extração, siga atentamente as instruções incluídas no Manual do utilizador do kit.

Plasma colhido em EDTA

As amostras de plasma para extração de ácido nucleico devem ser colhidas em EDTA de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas a +2°/+8 °C e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de três dias, caso contrário, devem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

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: quando realizar a extração de ADN de amostras de plasma com o instrumento **"MagNA Pure 24 System"** com **software versão 1.0** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **"Pathogen200"** siga estas instruções: distribua **350 µL** da amostra para o tubo de 2,0 mL de MagNA Pure, carregue o tubo no instrumento e inicie a extração. Este protocolo processa 200 µL de amostra, adiciona **CPE** a 20 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL. O **CPE** deve ser diluído 1:2 em água de

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

qualidade para biologia molecular ultra pura. Para obter mais informações sobre o procedimento de extração, siga atentamente as instruções incluídas no Manual do utilizador do kit.

Urina

As amostras de urina para extração de ácido nucleico devem ser colhidas em recipientes sem conservantes de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas à temperatura ambiente (+18/+25 °C) e guardadas à temperatura ambiente (+18 / +25 °C) durante um período máximo de quatro horas, caso contrário, devem ser guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de três dias. Se possível, evite congelar amostras de primeira urina. A congelação pode causar a precipitação de inibidores e a perda de título de ADN.

É recomendado separar as amostras a serem congeladas em alíquotas para evitar ciclos repetidos de congelação e descongelação e guardadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C durante períodos mais longos.

Nota: quando realizar a extração de ADN de amostras de urina com o instrumento "Sistema MagNA Pure 24" com software versão 1.0 (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração "Pathogen200" siga estas instruções: distribua 350 µL da amostra para o tubo de 2,0 mL de MagNA Pure, carregue o tubo no instrumento e inicie a extração. Este protocolo processa 200 µL de amostra, adiciona CPE a 20 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL. O CPE deve ser diluído 1:2 em água de qualidade para biologia molecular ultra pura. Para obter mais informações sobre o procedimento de extração, siga atentamente as instruções incluídas no Manual do utilizador do kit.

Outras amostras:

Não existem dados disponíveis relativos aos desempenhos do produto com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: líquido cefalorraquidiano (LCR), zaragatoa bucal, líquido amniótico, lavagem broncoalveolar (LBA) e aspirado brônquico (AB), suspensões de leucócitos, suspensões de granulócitos.

Substâncias interferentes

O ADN extraído da amostra não deve conter heparina, hemoglobina, dextran, Ficoll®, etanol ou 2-propanol para evitar problemas de inibição e a possibilidade de resultados inválidos frequentes.

Uma elevada quantidade de ADN genómico humano no ADN extraído da amostra pode inibir a reação de amplificação.

Não existem dados disponíveis relativos a uma inibição causada por fármacos antivirais, antibióticos, quimioterapêuticos ou imunossupressores.

Controlos de amplificação

É absolutamente obrigatório validar cada sessão de amplificação com uma reação de controlo negativo e uma reação de controlo positivo.

Para o controlo negativo, adicione água de qualidade para biologia molecular ultra pura (não fornecida com este kit) à reação no lugar do ADN extraído a partir da amostra.

Para o controlo positivo, utilize o produto «Controlo positivo CMV - ELITE» ou, em alternativa, o produto «RF de controlo positivo CMV - ELITE» ou o produto «CMV ELITE Standard».

Controlos da qualidade

Recomenda-se a validação de todo o procedimento de análise de cada sessão de extração e amplificação através de testes a Controlos do processo, isto é, uma amostra testada negativa e uma amostra testada positiva ou um material de referência calibrado.

PROCEDIMENTO

Definição da sessão de amplificação em tempo real

(Para realizar na área de amplificação/deteção de produtos de amplificação)

Quando for utilizado o instrumento analisador cobas z 480 (Roche):

- Antes de iniciar a sessão, e através da consulta da documentação do instrumento, é necessário:
 - ligar o computador de controlo e o ciclo térmico em tempo real. Abra o software dedicado e, na janela principal, abra uma sessão "Nova experiência";
 - defina o volume de reação ("Volume de reação") para 40 µL;
 - atribua um identificador a cada amostra ("Editor da amostra");

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

- defina o Ciclo térmico da reação de acordo com a seguinte tabela:

Ciclo térmico		
Fase	Temperaturas	Períodos
Descontaminação	50°C	2 mins.
Desnaturação inicial	94°C	2 mins.
Amplificação e deteção (45 ciclos)	94°C	10 seg.
	60 °C (aquisição de fluorescência)	30 seg.
	72°C	20 seg.
Dissociação (opcional)	95°C	15 seg.
	40°C	30 seg.
	80°C	15 seg.

Nota: a aquisição de fluorescência ocorre individualmente, defina a Taxa Ramp (°C/seg.) para 4,4 °C/seg.

- seleccione os canais de deteção do sinal: "detetor" para o sensor de CMV com "FAM 465-510 de canal" e "detetor" para o sensor de controlo interno CI com "VIC 540-580 de canal";

Preencha o Plano de trabalho anexado no final deste Manual do utilizador, transcrevendo esta informação ou imprimindo a disposição da microplaca. O Plano de trabalho deve ser atentamente seguido aquando da transferência da mistura de reação e das amostras para os furos.

Nota: para determinar a concentração de ADN na amostra inicial, deverá realizar uma série de reações com o Q - PCR Standard (10⁵ gEq, 10⁴ gEq, 10³ gEq, 10² gEq) para obter a Curva standard.

Veja a seguir, a título de exemplo, como pode organizar as análises quantitativas de 12 amostras.

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
N.F.	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵							

Legenda: C1 - C12: Amostras a serem analisadas; NC: Controlo de amplificação negativo; 10²: 10² gEq standard; 10³: 10³ gEq standard; 10⁴: 10⁴ gEq standard; 10⁵: 10⁵ gEq standard.

Preparação da amplificação

(A ser realizado na área de extração/preparação da reação de amplificação)

Antes de iniciar a sessão, é necessário:

- recuperar e descongelar os tubos de teste que contêm as amostras a serem analisadas. Agite suavemente os tubos e depois coloque-os na centrífugadora durante 5 segundos para enviar o conteúdo para o fundo; em seguida, mantenha em gelo;
- recuperar e descongelar os tubos de teste que contêm a Mistura CMV Q - PCR necessária para a sessão, sem esquecer que o conteúdo de cada tubo é suficiente para realizar 25 reações. Agite suavemente os tubos e depois coloque-os na centrífugadora durante 5 segundos para enviar o conteúdo para o fundo; em seguida, mantenha em gelo;
- recuperar e descongelar os tubos de teste que contêm o CMV - Controlo positivo ou, em

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

alternativa, o **RF de controlo positivo CMV - ELITE** ou **CMV Q - PCR Standard**. Agite suavemente os tubos e depois coloque-os na centrífugadora durante 5 segundos para enviar o conteúdo para o fundo; em seguida, mantenha em gelo;

- recuperar a **Placa AD** a ser utilizada na sessão, certificando-se de que usa luvas sem poeiras para a manusear e que não danifica os furos.

1. Sem criar quaisquer bolhas e depositando exatamente no fundo, transfira **20 µL** da mistura de reação **Mistura CMV Q - PCR** para os furos na **Placa AD** como previamente estabelecido no **Plano de trabalho**.

Nota: Se não usar a totalidade da mistura de reação, guarde qualquer mistura restante a -20 °C durante um período máximo de um mês. Congele e descongele a mistura de reação um máximo de **5 VEZES**.

2. Depositando precisamente na mistura de reação, transfira **20 µL** do **ADN extraído** da primeira amostra para o furo correspondente na **Placa AD** como previamente estabelecido no **Plano de trabalho**. Misture bem a amostra introduzindo com a pipeta o **ADN extraído** três vezes na mistura de reação. Certifique-se de que não cria quaisquer bolhas. Proceda da mesma forma com todo o restante **ADN extraído**.

3. Depositando precisamente na mistura de reação, transfira **20 µL** de **água de qualidade para biologia molecular ultra pura** (não fornecida com o produto) para o furo na **Placa AD** que contém o controlo de amplificação negativo, como previamente estabelecido no **Plano de trabalho**.

Misture bem o controlo negativo introduzindo com a pipeta a **água de qualidade para biologia molecular ultra pura** três vezes na mistura de reação. Certifique-se de que não cria quaisquer bolhas.

4. Com base no resultado necessário (qualitativo ou quantitativo), deve seguir uma das destas duas opções:

- quando for necessário um resultado **qualitativo** (deteção de ADN de CMV): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **CMV - Controlo positivo** ou, em alternativa, **RF de controlo positivo CMV - ELITE** no furo correspondente da **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o controlo positivo introduzindo com a pipeta o **CMV - Controlo positivo** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.

- Quando for necessário um resultado **quantitativo** (quantificação de ADN de CMV): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **CMV Q - PCR Standard 102** no furo correspondente na **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o padrão introduzindo com a pipeta o **CMV Q - PCR Standard 102** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma com os outros **CMV Q - PCR Standards (103, 104, 105)**.

5. Vede cuidadosamente a **Placa AD** utilizando a **Película vedante**.

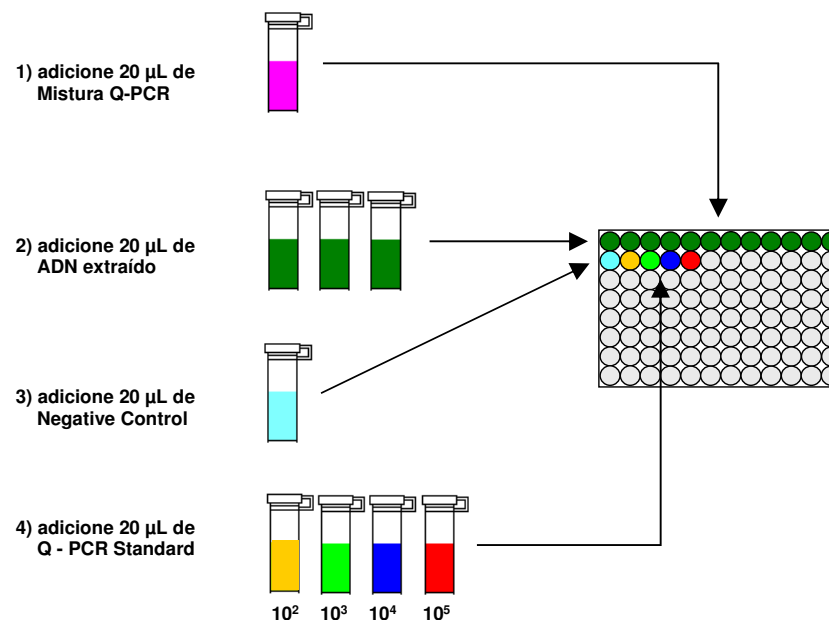
6. Transfira a **Placa AD** para o ciclo térmico em tempo real na área de amplificação/deteção de produtos de amplificação e inicie o ciclo térmico da amplificação, guardando as definições da sessão com um identificador único e reconhecível (por ex., "ano-mês-dia-CMV-EGSpA").

Nota: No final do ciclo térmico, a **Placa AD** e os produtos de reação devem ser removidos do instrumento e eliminados de uma forma que não cause poluição ambiental. **Nunca retire a Película vedante da microplaca da amplificação**, para evitar qualquer fuga dos produtos de reação.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

A figura seguinte mostra resumidamente a preparação da reação de amplificação.



Análise dos resultados qualitativos

Os valores de fluorescência emitidos pelo detetor de CMV e o detetor do Controlo Interno (CI) durante as reações de amplificação devem ser analisados pelo software do instrumento.

Selecione o menu "Análise" e escolha "Pontos absolutos de quant/ajuste" (2 pontos)

Selecione o grupo de amostras a serem analisadas

De acordo com a documentação do instrumento, antes de iniciar a análise deve:

- introduzir manualmente o intervalo de cálculo (Botão de fundo) para o **Nível de fluorescência de fundo** desde o ciclo 2 até ao ciclo 6.

Para amostras de **plasma e urina**:

- defina manualmente o **Limiar** e **Banda de ruído** para o detetor FAM "CMV" para **0,55**;
- defina manualmente o **Limiar** e **Banda de ruído** para o detetor VCI "CI" para **1,2**;

Para amostras de **Sangue Total**:

- defina manualmente o **Limiar** e **Banda de ruído** para o detetor FAM "CMV" para **0,80**;
- defina manualmente o **Limiar** e **Banda de ruído** para o detetor VCI "CI" para **1,5**;

Os valores de fluorescência emitidos pelos detetores específicos na reação de amplificação e os valores de fluorescência do **Limiar** e **Banda de ruído** são usados para determinar o **Ciclo do limiar (Ct)**, ou seja, o ciclo em que é alcançado o **Limiar** de fluorescência.

Os valores **Ct** para CMV nas reações de amplificação dos quatro **Q - PCR Standard** são usados para calcular a **Curva Standard** (Resultados > Curva Standard) dessa sessão de amplificação e para validar a amplificação e a deteção como mostrado na tabela seguinte:

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

Reação Q - PCR Standard 10 ⁵ Detetor "CMV"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETO

Curva Standard Detetor "CMV"	Intervalo de aceitação	Amplificação/deteção
Coefficiente de correlação (R2)	0,99 ≤ R2 ≤ 1,0	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação para o Q - PCR Standard 10⁵ for Ct > 25 ou Ct não determinado ou se o valor do Coeficiente de correlação (R2) não se encontrar dentro dos limites, o ADN alvo não foi corretamente detetado. Ocorreram problemas durante a fase de amplificação ou deteção (distribuição incorreta da mistura de reação ou dos standards, degradação da mistura de reação ou dos standards, definição incorreta da posição dos standards, definição incorreta do ciclo térmico) que podem causar resultados incorretos. A sessão é inválida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Durante a reação de amplificação **Controlo negativo**, o valor de Ct do CMV (Janela de análise) é usado para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Reação de controlo negativo Detetor "CMV"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct não determinado	NEGATIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação **Controlo negativo** for diferente de Ct não determinado para CMV, foi detetada a presença do ADN alvo. Ocorreram problemas durante a fase de amplificação (contaminação) que podem causar resultados incorretos e falsos positivos. A sessão é inválida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Durante as reações de amplificação para cada amostra, o valor de Ct do CMV é usado para determinar a presença do ADN alvo, enquanto o valor de Ct para o Controlo Interno é usado para validar a extração, amplificação e deteção.

Nota: Verifique com o software do instrumento (Janela de análise) que o Ct foi determinado por um aumento rápido e regular dos valores de fluorescência e não por picos ou um aumento do sinal de fundo (fundo irregular ou ruidoso).

Os resultados como o Ct das reações de amplificação de cada amostra (Janela de análise) são usados como mostrado na tabela seguinte:

Reação da amostra		Adequação da amostra	Resultado do ensaio	ADN de CMV
Detetor "CMV"	Detetor "IC"			
Ct não determinado	Ct > 35 ou Ct não determinado	não adequado	inválido	-
	Ct ≤ 35	adequado	válido, negativo	NÃO DETETADO
Ct determinado	Ct > 35 ou Ct não determinado	adequado	válido, positivo	DETETADO
	Ct ≤ 35	adequado	válido, positivo	DETETADO

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for Ct não determinado para CMV e Ct > 35 ou Ct não determinado para o Controlo Interno, não foi possível detetar eficientemente o ADN do Controlo Interno. Neste caso, ocorreram problemas durante a fase de amplificação (amplificação ineficiente ou nula) ou na fase de extração (ADN da amostra degradado, amostra com números insuficientes de células, perda de ADN durante a extração ou presença de inibidores no ADN extraído) que podem causar resultados incorretos e falsos negativos. A amostra não é adequada, o ensaio não é válido e deve ser repetido, começando pela extração de uma nova amostra.

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for Ct não determinado para CMV e Ct ≤ 35 para o Controlo Interno, o ADN do CMV não foi detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

excluir-se o facto de o ADN do CMV estar presente a uma concentração inferior ao limite de deteção do produto (ver Características de desempenho). Neste caso, o resultado constituiria um falso negativo.

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

Nota: Quando for detetado o ADN do CMV durante a reação de amplificação de uma amostra, a amplificação do Controlo Interno pode produzir um resultado de Ct > 35 ou Ct não determinado. Na realidade, a reação de amplificação do Controlo Interno de baixa eficiência pode ser eliminada da competição com a reação de CMV de elevada eficiência. Neste caso, a amostra é adequada e o resultado positivo do ensaio é válido.

Análise dos resultados quantitativos

Após ter realizado o procedimento de análise qualitativa, pode efetuar a análise quantitativa dos resultados relacionados com a amostra positiva.

Se o resultado da reação de amplificação para o Q - PCR Standard 10⁵ for Ct > 25 ou Ct não determinado ou se os valores de Ct dos quatro Q - PCR standards não se ajustarem regularmente à curva standard, o ADN alvo não foi corretamente detetado. Ocorreram problemas durante a fase de amplificação ou deteção (distribuição incorreta da mistura de reação ou dos standards, degradação da mistura de reação ou dos standards, definição incorreta da posição dos standards, definição incorreta do ciclo térmico) que podem causar resultados incorretos. A sessão é inválida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Os valores de Ct para o CMV nas reações de amplificação de cada amostra e a Curva standard (botão Curva standard) da sessão de amplificação são usados para calcular a Quantidade de ADN alvo presente nas reações de amplificação relacionadas com as amostras.

Este produto é capaz de quantificar desde 1.000.000 até cerca de 10 Equivalentes do genoma por reação, desde 25.000.000 a 250 Equivalentes do genoma por mL utilizando o sistema de extração **MagNA Pure 24** (ver Características de desempenho), como mostrados na tabela seguinte:

Resultado da amostra Detetor FAM "CMV"	Equivalentes do genoma CMV por reação
Quantidade > 1 x 10 ⁶	MAIS DE 1.000.000
1,0 x 10 ¹ ≤ Quantidade ≤ 1 x 10 ⁶	= Quantidade
Quantidade < 1,0 x 10 ¹	MENOS DE 10

Os resultados (Quantidade) relacionados com cada amostra (Janela de análise) são usados para calcular os Equivalentes do genoma (gEq) de CMV presentes na amostra de origem (Nc) de acordo com esta fórmula:

$$Nc = \frac{Ve \times \text{Quantidade}}{Vc \times Va \times Ep}$$

Onde:

Vc é a quantidade da amostra usada na extração relativamente à unidade de medida exigida;

Ep é a eficiência do procedimento, extração e amplificação, expressa em decimais,

Ve é o volume total obtido da extração expresso em µL;

Va é o volume do produto de extração usado na reação de amplificação expresso em µL;

Quantidade é o resultado da reação de amplificação relacionado com a amostra expressa em gEq por reação.

Quando utilizar amostras de sangue total e plasma colhido em EDTA e urina e o sistema de extração **MagNA Pure 24** e o resultado tiver de ser expresso em gEq/mL, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para sangue total, plasma e urina e MagNA Pure 24
$Nc \text{ (gEq/mL)} = 25 \times \text{Quantidade}$

Conversão dos resultados para unidades internacionais

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

Quando forem usadas amostras de sangue total colhido em EDTA e o **MagNA Pure 24** e for necessário fornecer o resultado em **IU/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para sangue total e MagNA Pure 24	
Fc = 0,5 IU/gEq	
Nc (IU/mL) = Nc (gEq/mL) x Fc	
Nc (IU/mL) = 12,5 x Quantidade	

Quando forem usadas amostras de plasma colhido em EDTA e o **MagNA Pure 24** e for necessário fornecer o resultado em **IU/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para plasma e MagNA Pure 24	
Fc = 0,4 IU/gEq	
Nc (IU/mL) = Nc (gEq/mL) x Fc	
Nc (IU/mL) = 10 x Quantidade	

Quando forem usadas amostras de urina e o **MagNA Pure 24** e for necessário fornecer o resultado em **IU/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para urina e MagNA Pure 24	
Fc = 1,1 IU/gEq	
Nc (IU/mL) = Nc (gEq/mL) x Fc	
Nc (IU/mL) = 27,5 x Quantidade	

Onde **Fc** for o fator de conversão calculado utilizando o material de referência calibrado aprovado pela OMS "1.^ª Norma internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico (NAT)", NIBSC código 09/162, Reino Unido (ver o parágrafo Características de desempenho).

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade analítica: limite de detecção

A sensibilidade analítica deste ensaio, como limite de detecção, permite a detecção de cerca de 10 cópias em 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A sensibilidade analítica deste ensaio, como limite de detecção, foi testado usando um ADN de plasmídeo que contém o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida usando um espectrofotômetro. O ADN de plasmídeo foi diluído para uma concentração de 10 cópias/20 µL em 150.000 cópias de pBETAGLOBIN/20 µL. Esta amostra foi utilizada em 27 réplicas para realizar a amplificação utilizando produtos ELITechGroup S.p.A..

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivos	negativos
10 cópias de ADN de plasmídeo + 150.000 cópias de Beta-globina	27	26	1

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de sangue total, plasma e urina e o **MagNA Pure 24** foi verificada com um painel de diluições de CMV dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da "1.^ª norma internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/162, Reino Unido) em ADN CMV - matriz negativa. O painel era constituído por seis pontos à volta da concentração limite. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas através da realização da extração utilizando o sistema automático **MAGNA Pure 24** e amplificação utilizando produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de detecção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

Os resultados finais de cada matriz são comunicados nas tabelas seguintes.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

Limite de detecção com o MagNA Pure 24 IU/mL (IU/mL)			
Matriz	95% de positividade	intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
sangue total	135 IU/mL	84 IU/mL	354 IU/mL
plasma	88 IU/mL	54 IU/mL	279 IU/mL
urina	296 IU/mL	174 IU/mL	851 IU/mL

A sensibilidade analítica como gEq/mL para cada matriz é calculada através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 70.

A sensibilidade analítica como gEq/mL está reportada a seguir.

Limite de detecção com o MagNA Pure 24 (gEq/mL)			
Matriz	95% de positividade	intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
sangue total	270 gEq/mL	168 gEq/mL	708 gEq/mL
plasma	220 gEq/mL	108 gEq/mL	698 gEq/mL
urina	269 gEq/mL	158 gEq/mL	774 gEq/mL

Sensibilidade analítica: intervalo de medição linear

A sensibilidade analítica deste ensaio, como intervalo de medição linear, permite a quantificação desde cerca de 1.000.000 até cerca de 10 Equivalentes do genoma em 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A sensibilidade analítica deste ensaio foi avaliada com recurso a um painel de diluições (1 registado entre uma diluição e a seguinte) de ADN de plasmídeo contendo o produto de amplificação, cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotômetro. Os pontos do painel de 10⁷ moléculas por reação a 10¹ moléculas por reação foram testadas em 9 réplicas para realização da amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise dos dados obtidos, realizada com regressão linear, mostrou que o ensaio tem uma resposta linear para todos os pontos do painel (coeficiente de correlação linear superior a 0,99).

O limite inferior do intervalo de medição linear foi definido a cerca de 10 gEq/reação dentro de 1 algoritmo desde a concentração mais baixa do standard de amplificação Q - PCR Standard (10² gEq/20 µL).

O limite superior do intervalo de medição linear foi definido a 10⁶ gEq/reação, dentro de um algoritmo desde a concentração mais alta do standard de amplificação Q - PCR Standard (10⁵ gEq/20 µL).

Os resultados estão mostrados na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear utilizando o MagNA Pure 24		
	Limite inferior	Limite superior
gEq/mL	250	25.000.000
gEq/reação	10	1.000.000

As conversões de gEq/mL para gEq/reação e vice-versa foram calculadas como mostrado na página 60.

A linearidade deste ensaio usado em associação com diferentes matrizes e o **MagNA Pure 24** foi verificada com um painel de diluições de CMV. O painel foi preparado através da diluição da "1.^ª norma internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/162, Reino Unido) em ADN CMV - matriz negativa. O painel era constituído por cinco pontos de diluição (passos de diluição de 1 registado) a partir de 10⁵ IU/mL a 10² IU/mL. Cada amostra do painel foi testada em quatro réplicas através da realização da extração utilizando o sistema automático **MAGNA Pure 24** e amplificação utilizando produtos ELITechGroup S.p.A. A análise dos dados obtidos, realizada por regressão linear, demonstrou que o ensaio mostra uma resposta linear para todas as diluições acima do LoD.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

Limite de quantificação

O limite inferior do intervalo de medição linear foi definido à concentração mais baixa a fornecer 100% de positividade e resultados quantitativos suficientemente exatos e precisos. O limite superior do intervalo de medição linear foi definido à concentração mais alta testada que fornece resultados quantitativos suficientemente exatos e precisos.

O intervalo de medição linear como gEq/mL para cada matriz é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 70.

Os resultados de cada matriz são comunicados nas tabelas seguintes.

Intervalo de medição linear para amostras de sangue total e o MagNA Pure 24

Unidade de medida	Limite inferior	Limite superior
IU/mL	178	1.000.000
gEq/mL	356	2.000.000

Intervalo de medição linear para amostras de plasma e o MagNA Pure 24

Unidade de medida	Limite inferior	Limite superior
IU/mL	100	1.000.000
gEq/mL	250	2.500.000

Intervalo de medição linear para amostras de urina e o MagNA Pure 24

Unidade de medida	Limite inferior	Limite superior
IU/mL	1000	1.000.000
gEq/mL	909	909.091

Sensibilidade analítica: Precisão e exatidão

A precisão deste ensaio, em termos de variabilidade dos resultados obtidos na mesma sessão de amplificação utilizando diferentes réplicas de uma amostra, permitiu obter uma percentagem máxima do Coeficiente de variação (% CV) dos valores de Ct inferior a 1,36%, dentro do intervalo de 10^6 moléculas a 10^1 moléculas em 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A precisão deste ensaio, em termos de variabilidade dos resultados obtidos na mesma sessão de amplificação utilizando diferentes réplicas de uma amostra, permitiu obter uma percentagem média do Coeficiente de variação (% CV) das quantidades medidas de cerca de 12,5% dentro do intervalo de 10^6 moléculas a 10^1 moléculas em 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A precisão deste ensaio, em termos de diferença entre a média dos resultados obtidos na mesma sessão de amplificação utilizando diferentes réplicas de uma amostra e o valor de concentração teórica da amostra, permitiu obter uma percentagem média de Imprecisão da quantidade de Registo medida de cerca de 2,2% dentro do intervalo de 10^6 moléculas a 10^1 moléculas em 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A precisão e a exatidão foram determinadas utilizando os dados obtidos durante as experiências que avaliam o intervalo de medição linear.

Capacidade de reprodução com material de referência certificado

A sensibilidade analítica do ensaio foi avaliada utilizando como material de referência o painel calibrado «Painel AcroMatrix® CMV_{ic}» (Acrometrix, Life Technologies, EUA). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas através da realização da extração utilizando o sistema de extração automática **MAGNA Pure 24** e amplificação utilizando produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados em IU/mL foram calculados através da aplicação do fator de conversão para o **MAGNA Pure 24** e plasma e são comunicados na tabela seguinte.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

Testes com materiais de referência calibrados e o MAGNA Pure 24

Amostra	Título nominal IU/mL	Registo IU/mL do título nominal	Positivo/réplicas	Resultados médios IU/mL de Registo
CMV ADN 3E6	3.000.000	6,477	2/2	6,299
CMV ADN 3E5	300.000	5,477	2/2	5,280
CMV ADN 3E4	30.000	4,477	2/2	4,298
CMV ADN 3E3	3.000	3,477	2/2	3,364
CMV ADN 3E2	300	2,477	2/2	2,262

Todas as amostras foram detetadas como positivas, com um título que se encontra dentro do valor esperado de Registo $\pm 0,5$.

Fator de conversão para unidades internacionais

O fator de conversão a ser utilizado com este ensaio para transformar o resultado quantitativo de gEq/mL em Unidades internacionais/mL foi determinado utilizando um painel de material de referência calibrado aprovado pela OMS ("1.ª Norma internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/162, Reino Unido) nas diferentes matrizes negativas para ADN de CMV e em associação com o **MAGNA Pure 24**. O painel incluiu 6 passos de diluição de 1 Registo. Cada ponto do painel foi testado em 16 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática **MAGNA Pure 24** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

A análise dos dados obtidos permitiu calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 0,5 Unidades internacionais (IU) por gEq de CMV detetado com amostras de **sangue total**.

Os resultados de cada matriz são comunicados na tabela seguinte.

Conversão para Unidades internacionais com sangue total e «MAGNA Pure» (Fc = 0,5 IU/gEq)

Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registo ₁₀	Quantidade média gEq/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registo ₁₀
111.055	5,046	197.188	98.594	4,991
34.903	4,543	73.891	36.945	4,556
10.970	4,040	23.428	11.714	4,050
3.448	3,538	8.863	4.431	3,605
1.084	3,035	2.963	1.481	3,136
341	2,532	995	497	2,638

A análise dos dados obtidos permitiu calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 0,4 Unidades internacionais (IU) por gEq de CMV detetado com amostras de **plasma**.

Os resultados de cada matriz são comunicados na tabela seguinte.

Conversão para Unidades internacionais com plasma e «MAGNA Pure» (Fc = 0,4 IU/gEq)

Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registo ₁₀	Quantidade média gEq/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registo ₁₀
111.055	5,046	235.469	94.188	4,969
34.903	4,543	89.375	35.750	4,548
10.970	4,040	25.950	10.380	4,008
3.448	3,538	9.683	3.873	3,576
1.084	3,035	3.189	1.276	3,086
341	2,532	910	364	2,526

A análise dos dados obtidos permitiu calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 1,1 Unidades internacionais (IU) por gEq de CMV detetado com amostras de **urina**.

Os resultados de cada matriz são comunicados na tabela seguinte.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

Conversão para Unidades internacionais com urina e «MagNA Pure» (Fc = 1,1 IU/gEq)				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registro ₁₀	Quantidade média gEq/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registro ₁₀
316.228	5,500	217.719	242.110	5,379
100.000	5,000	91.719	100.891	4,995
31.623	4,500	33.484	36.833	4,557
10.000	4,000	10.550	11.605	4,053
3.162	3,500	3.434	3.777	3,565
1.000	3,000	1.050	1.155	3,054

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 51 amostras de sangue total colhido em EDTA positivo para ADN de CMV (testado utilizando um produto de amplificação em tempo real CE IVD), 63 amostras de plasma colhido em EDTA positivo para ADN de CMV (testado utilizando um produto de amplificação em tempo real CE IVD), 6 amostras de urina positivas para ADN de CMV (testado utilizando um produto de amplificação em tempo real CE IVD) e 45 amostras de urina negativas para ADN de CMV e que foram reforçadas para ADN de CMV através da adição da "1.ª Norma internacional da OMS para Citomegalovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC, Reino Unido, código 09/162).

Cada amostra foi usada para realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática **MagNA Pure 24** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivos	negativos
Sangue total colhido em EDTA e positivo para ADN de CMV	51	51	0
Plasma colhido em EDTA positivo para ADN de CMV	63	62	1
Urina positiva para ADN de CMV	6	6	0
Urina reforçada para ADN de CMV	45	44	1

Todas as amostras foram válidas no primeiro teste.

Todas as amostras de sangue total foram confirmadas positivas para ADN de CMV. A sensibilidade de diagnóstico do ensaio associado às amostras de sangue total foi de 100%.

Sessenta e duas (62) amostras em 63 amostras de plasma foram confirmadas positivas para ADN de CMV, enquanto uma amostra mostrou um resultado discrepante negativo. A sensibilidade de diagnóstico do ensaio associado às amostras de plasma foi de 98%.

Todas as amostras clínicas de urina foram confirmadas positivas para ADN de CMV.

Uma amostra de urina reforçada mostrou um resultado discrepante negativo utilizando produtos ELITechGroup S.p.A. Uma explicação para esta discrepância pode ser um erro de preparação por parte do operador.

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio associado às amostras de urina foi de 98%.

A sensibilidade de diagnóstico total do ensaio foi de 98,8%.

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 53 amostras de sangue total colhido em EDTA presumivelmente negativas para ADN de CMV, 50 amostras de plasma colhido em EDTA presumivelmente negativas para ADN de CMV, 49 amostras de urina presumivelmente negativas para ADN de CMV.

Cada amostra foi usada para realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática **MagNA Pure 24** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivos	negativos
Sangue total colhido em EDTA presumivelmente negativo para ADN de CMV	53	1	52

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

Amostras	N	positivos	negativos
Plasma colhido em EDTA e presumivelmente negativo para ADN de CMV	50	2	48
Urina presumivelmente negativa para ADN de CMV	49	0	49

Todas as amostras de sangue total foram válidas no primeiro teste e cinquenta e duas (52) de 53 as amostras de sangue total foram confirmadas negativas para ADN de CMV, enquanto uma amostra mostrou um resultado discrepante positivo. A especificidade de diagnóstico do ensaio associada às amostras de sangue total foi de 98%.

Quarenta e nove (49) de 50 amostras de plasma foram válidas no primeiro teste, uma amostra inválida mostrou um resultado negativo após a reamplificação. Quarenta e oito (48) em 50 amostras de plasma foram confirmadas negativas para ADN de CMV, enquanto duas amostras mostraram resultados discrepantes positivos. A especificidade de diagnóstico do ensaio associado às amostras de plasma foi de 96%.

Todas as amostras de urina foram válidas no primeiro teste e confirmadas negativas para ADN de CMV. A especificidade de diagnóstico do ensaio associado às amostras de urina foi de 100%.

A especificidade de diagnóstico total do ensaio foi de 98%.

Nota: Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e os instrumentos estão registados na Secção 7 do Ficheiro técnico do produto "CMV ELITE MGB® Kit", FTP RTK015PLD.

REFERÊNCIAS

T. E. Fenner et al. (1991) *J Clin Microbiology* 29: 2621 - 2622
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Use este produto apenas com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: sangue total colhido em EDTA, plasma colhido em EDTA, líquido cefalorraquidiano (CSF), urina, esfregaço bucal, líquido amniótico e BAL.

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

Não use ADN extraído que esteja contaminado com hemoglobina, dextran, Ficoll®, etanol ou 2-propanol com este produto: estas substâncias inibem a reação de amplificação dos ácidos nucleicos e pode causar resultados inválidos.

Não use com este produto ADN extraído contendo uma elevada quantidade de ADN genómico humano que possa inibir a reação de amplificação de ácidos nucleicos.

Não existem dados disponíveis relativos aos desempenhos do produto com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: suspensões de leucócitos, suspensões de granulócitos.

Este produto apenas com instrumentos validados e amostras clínicas associadas indicados na secção "Amostras e controlos".

Não existem dados disponíveis relativos a uma inibição causada por fármacos antivirais, antibióticos, quimioterapêuticos ou imunossuppressores.

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 clínicas positivas do CMV, 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.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

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

Quando a sessão de amplificação for configurada manualmente, é necessário ter áreas separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação, para evitar falsos resultados positivos.

Quando a sessão de amplificação for configurada manualmente, este produto requer o uso de vestuário e instrumentos especiais para extração/preparação de reações de amplificação e para amplificação/deteção de produtos de amplificação, para evitar falsos resultados positivos.

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

Um resultado negativo obtido com este produto significa que o ADN de CMV não foi detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode negligenciar-se o facto de o ADN de CMV 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 e exigir um novo teste, começando pela extração; o que pode causar um atraso na obtenção dos resultados finais.

Possíveis polimorfismos na região do genoma viral abrangido pelos primários do produto e as sondas podem prejudicar a deteção e quantificação do ADN do Enterovírus.

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, como o diagnóstico pré-natal ou de urgência, este risco residual pode contribuir para decisões erradas com potenciais efeitos perigosos para o doente.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

ADN alvo não detetado nas reações de Positive Control ou Q - PCR Standard ou coeficiente de correlação inválido da Curva standard	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	Tenha cuidado quando distribuir reagentes para os furos da microplaca e cumpra a ficha de trabalho. Verifique os volumes da mistura de reação distribuída. Verifique os volumes do controlo positivo ou standard distribuído.
Preparação da sessão incorreta no ELITE InGenius e no ELITE BeGenius	Verifique a posição da mistura de reação, do controlo positivo ou dos standards. Verifique os volumes da mistura de reação, do controlo positivo ou dos standards.
Degradação da sonda.	Use uma nova alíquota da mistura de reação.
Degradação do controlo positivo ou standard.	Utilize uma nova alíquota de controlo positivo ou standard.
Erro na configuração do instrumento.	Verifique as definições de posição para as reações standard no instrumento. Verifique as definições do ciclo térmico no instrumento.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTK015PLD

ADN alvo detetado na reação de Negative Control	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	Evite derramar o conteúdo do tubo de teste da amostra. Mude sempre as pontas entre uma amostra e a outra. Tenha cuidado quando distribuir amostras, controlo negativo e standards para os furos da microplaca e cumpra a ficha de trabalho.
Preparação da sessão incorreta no ELITE InGenius e no ELITE BeGenius	Verifique a posição da mistura de reação ou do controlo negativo. Verifique os volumes da mistura de reação ou do controlo negativo.
Erro durante a definição do instrumento.	Verifique as definições de posição das amostras, do controlo negativo e dos standards no instrumento.
Microplaca mal vedada.	Tenha cuidado quando vedar a microplaca.
Contaminação da água de qualidade para biologia molecular.	Utilize uma nova alíquota de água.
Contaminação da mistura de reação.	Use uma nova alíquota da mistura de reação.
Contaminação da área de extração/preparação para reações de amplificação.	Limpe as superfícies e instrumentos 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.

ADN alvo e de Internal Control não detetado nas reações da amostra	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	Evite derramar o conteúdo do tubo de teste da amostra. Mude sempre as pontas entre uma amostra e a outra. Tenha cuidado quando distribuir amostras para os furos da microplaca e cumpra a ficha de trabalho.
Preparação da sessão incorreta no ELITE InGenius e no ELITE BeGenius	Verifique a posição da mistura de reação ou das amostras. Verifique os volumes da mistura de reação ou das amostras.
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 "PCR only". Repita a extração e amplificação da amostra.
Armazenamento incorreto do reagente.	Verifique se a mistura de reação não foi exposta a uma temperatura ambiente durante mais de 30 minutos.
Problemas durante a extração	Verifique a qualidade e a concentração do ADN extraído.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Fluorescência de fundo irregular ou elevada nas reações	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta da amostra.	Tenha cuidado, inserindo a pipeta três vezes, quando misturar amostras, controlos negativos e standards na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

Erro na configuração da linha de base.	Defina o intervalo de cálculo da linha de base dentro dos ciclos onde a fluorescência de fundo já estabilizou (verifique os dados "Resultados", "Componente") e a fluorescência do sinal ainda não tenha começado a aumentar, por ex. do ciclo 6 para o ciclo 15. Utilize o cálculo automático da linha de base configurando a opção "Linha de base auto".
--	---

Curva de dissociação anômala	
Causas possíveis	Soluções
Ausência de um pico definido. Pico definido mas diferente do de outras amostras e dos standards ou do controlo positivo.	Procure um detetor FAM Ct 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 ADN alvo com uma possível mutação. O ADN alvo da amostra deve ser sequenciado para confirmar a mutação.












Erro 30103 no ELITE InGenius	
Causas possíveis	Soluções
Concentração demasiado alta do alvo na amostra.	Se for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR: - repita a amplificação com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR Only" ou - repita a extração com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular da amostra numa sessão "Extração + PCR".

Elevada taxa anômala 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 PCR Mix e/ou CPE.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

SÍMBOLOS

-  Número do catálogo.
-  Limite máximo da temperatura.
-  Código do lote.
-  Usar até (último dia do mês).
-  Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*.
-  Cumprimento dos requisitos da Diretiva Europeia 98/79/CE relativa a dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*. Certificação publicada pela DEKRA Certification B.V., Holanda.
-  Contém suficiente para "N" testes.
-  Atenção, consulte as instruções de utilização.
-  Conteúdo.
-  Manter afastado da luz solar.
-  Fabricante.

CMV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTK015PLD

**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 números de patente dos EUA 6.127.121, 6.485.906, 6.660.845, 6.699.975, 6.727.356, 6.790.945, 6.949.367, 6.972.328, 7.045.610, 7.319.022, 7.368.549, 7.381.818, 7.662.942, 7.671.218, 7.715.989, 7.723.038, 7.759.126, 7.767.834, 7.897.736, 8.008.522, 8.067.177, 8.163.910, 8.389.745, 8.969.003, 8.980.855, 9.056.887, 9.085.800, 9.169.256 e números de patente EP, 0819133, 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 bem como os 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®» e o logótipo «ELITe MGB®» são marcas comerciais registadas na União Europeia.

ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® são marcas comerciais registadas do ELITechGroup

«NucliSENS® easyMAG®» são marcas comerciais registadas da bioMérieux SA.

«QIASymphony®» é uma marca comercial registada da QIAGEN GmbH.

Ficol® é uma marca comercial registada da GE Healthcare Bio-Sciences AB.

MagNA Pure é uma marca comercial da Roche.

CMV ELITE MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTK015PLD



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 «**CMV ELITE MGB® Kit**» product is a **qualitative** and **quantitative** nucleic acids amplification assay for the detection and quantification of the DNA of Human Cytomegalovirus (CMV) in DNA samples extracted from whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA, cerebrospinal fluid (CSF), urine, buccal swab, amniotic fluid and bronchoalveolar lavage (BAL) / bronchial aspirate (BA).

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of CMV infections, alongside patient clinical data and other laboratory test outcomes.

The assay is CE-IVD validated in combination with **Whole Blood EDTA and Plasma EDTA** and the instruments **ELITE InGenius** and **ELITE BeGenius**.

The assay is CE-IVD validated in combination with **Cerebrospinal Fluid, Urine, Buccal swab, Amniotic fluid, BAL, BA** and the instrument **ELITE InGenius**.

B. Amplified sequence

	Gene	Fluorophore
Target	CMV MIEA gene (exon 4 region)	FAM
Internal Control	Human beta Globin gene	AP525

C. Validated matrix

Whole Blood EDTA, Plasma EDTA, Cerebrospinal Fluid, Urine, Buccal swab, Amniotic fluid, BAL, BA

D. Kit component

CMV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 96
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

ELITE InGenius instrument: INT030	›	CMV - ELITE Positive Control: CTR015PLD
ELITE BeGenius instrument: INT040	›	CMV ELITE Standard: STD015PLD
ELITE InGenius SP200 Extraction Cartridge: INT032SP200	›	ELITE InGenius Waste Box: F2102-000
ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR	›	300 µL Filter Tips Axygen : TF-350-L-R-S (for INT030)
ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS	›	1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118 (for INT040)
CPE – Internal Control: CTCPE		

F. ELITE InGenius protocol

- › Sample volume 200 µL
- › CPE Internal Control volume 10 µL
- › Total eluate volume 100 µL
- › PCR eluate input volume 20 µL
- › CMV Q-PCR Mix volume 20 µL
- › Unit of quantitative result International Unit: IU/mL genome equivalent: gEq/mL (equivalent to copies/mL)
- › Frequency of controls 15 days
- › Frequency of calibration 60 days

G. ELITE InGenius/ELITE BeGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	109 IU/mL – 156 gEq/mL	100% 60/60*	93% 55/59*
Plasma	88 IU/mL – 293gEq/mL	100% 54/54*	98% 57/58*

*confirmed samples/ tested samples

Matrix	Linearity (gEq/mL)	Linearity (IU/mL)	CF gEq/mL to IU/mL
Whole Blood	254 – 1.4x10 ⁸	178 – 1 x10 ⁸	0.7
Plasma	293 – 3.3x10 ⁸	88 – 1 x10 ⁸	0.3

H. ELITe InGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Cerebrospinal fluid	58 IU/mL – 193 gEq/mL	100% 20/20*	100% 20/20*
Urine	151 IU/mL – 216 gEq/mL	100% 31/31*	100% 54/54*
Buccal swab	44 IU/mL – 220 gEq/mL	100% 50/50*	96% 50/52*
Amniotic fluid	57 IU/mL – 285 gEq/mL	100% 31/31*	100% 32/32*
BAL / BA	97 IU/mL – 485 gEq/mL	100% 49/49*	100% 49/49*

Matrix	Linearity (gEq/mL)	Linearity (IU/mL)	CF gEq/mL to IU/mL
Cerebrospinal fluid	335 – 5x10 ⁷	101 – 1,5 x10 ⁷	0.3
Urine	451 – 5x10 ⁷	316 – 3,5 x10 ⁷	0.7
Buccal swab	500 – 5x10 ⁷	100 – 1,0 x10 ⁷	0.2
Amniotic fluid	500 – 5x10 ⁷	100 – 1,0 x10 ⁷	0.2
BAL / BA	890 – 5x10 ⁷	178 – 1,0 x10 ⁷	0.2

H. Reference Material

Panel name	Provider	Qualitative results	Quantitative results
Molecular Q Panel: CMVMQP01	Qnostics	Concordance 100% (4/4)*	Titre as expected value ± 0.5 log
Acrometrix: CMVDNA3E	Thermo-Fisher	Concordance 100% (5/5)*	Titre as expected value ± 0.5 log
QCMD 2014: CMVDNA14	Qnostics	Concordance 100% (10/10)*	Titre as expected value ± 1 log**

*confirmed samples/ tested samples

**within the range of quantification

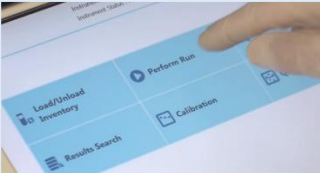
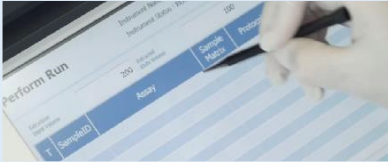

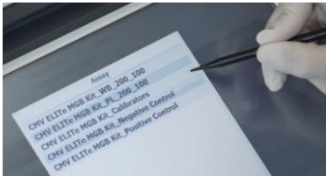


I. ELITe InGenius Procedures

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.

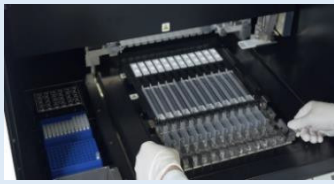
Before analysis

1. Switch on ELITe InGenius Identification with username and password Select the mode “Closed”	2. Verify calibrators: CMV Q-PCR standard in the “Calibration menu” Verify controls: CMV pos. and neg. controls in the “Control menu” <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired	3. Thaw the CMV Q- PCR-Mix 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”, elute: “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: Primary tube or sonication tube 	6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in the inventory block 

7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, sonication tube and primary sample 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 rack n°4

7. Load the PCR cassette rack
Load the Q-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 :
Primary tube or Secondary tube

6. Load the CPE Internal Control in the inventory block

7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, sonication tube and primary sample racks

8. Close the door
Start the run

9. Archive the eluate sample

ELITE BeGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITE BeGenius software to prepare the run. All 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 BeGenius Identification with username and password
Select the mode "Closed"

2. Verify calibrators: CMV Q-PCR standard in the "Calibration menu"
Verify controls: CMV pos. and neg. controls in the "Control menu"
NB: Both have been run, approved and not expired

3. Thaw the CMV Q- PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes
Vortex gently
Spin down 5 sec

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

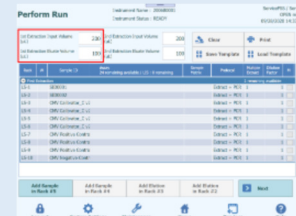
1. Select "Perform Run" on the touch screen



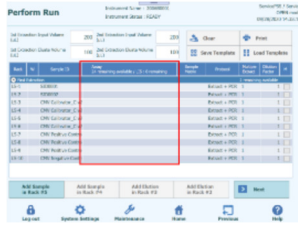
2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active



3. Verify the extraction volumes:
Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"

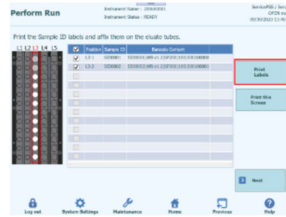


4. Select the "Assay protocol" of interest



Note: if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4

5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area



6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in Reagent Rack and insert it in the cooling area



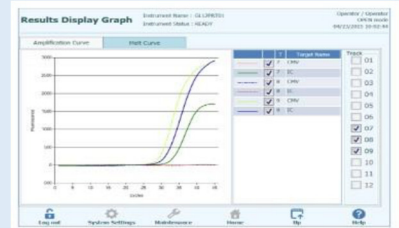
7. Load: Filter Tips, Extraction rack, and PCR rack



8. Close the door Start the run



9. View, approve and store the results



Procedure 2 - PCR only

1. Select "Perform Run" on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»

4. Load the Q-PCR-Mix in Reagent Rack and insert it in the cooling area
Load filter tips and the PCR rack

2. Load the extracted nucleic acid barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area

5. Close the door.
Start the run

3. Select the "Assay protocol" of interest

6. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above

7. Load: Filter Tips and the Extraction Rack

5. Select the protocol "Extraction Only" in the Assay Protocol selection screen.

8. Close the door
Start the run

6. Load the CPE Internal Control in the Elution Rack and insert it in the cooling area

9. Archive the eluate sample

CMV ELITE MGB® kit used with ELITE InGenius®

ELITE InGenius® SP 1000

Ref: RTK015PLD



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 CMV ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection** and **quantification** of the DNA of **Human Cytomegalovirus (CMV)**.
The assay is CE-IVD validated in combination with the instrument **ELITE InGenius®**.

B. Amplified sequence

	Gene	Fluorophore
Target	CMV MIEA gene (exon 4 region)	FAM
Internal Control	Human beta Globin gene	AP525

C. Validated matrix

Plasma EDTA

D. Kit component

CMV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 96
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

ELITE InGenius instrument: INT030

ELITE InGenius SP1000 Extraction Cartridge:
INT033SP1000

ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR

ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS

CPE – Internal Control: CTCRPE

- › **CMV ELITE Positive Control:** CTR015PLD
- › **CMV ELITE Standard:** STD015PLD
- › **ELITE InGenius Waste Box:** F2102-000
- › **Filter Tips 300:** TF-350-L-R-S

F. ELITE InGenius protocol

› Sample volume	1000 µL	› Unit of quantitative result	International Unit: IU/mL genome equivalent:
› CPE Internal Control volume	10 µL		gEq/mL (<i>equivalent to</i>
› Total eluate volume	100 µL		<i>copies/mL</i>) 15 days
› PCR eluate input volume	20 µL	› Frequency of controls	60 days
› CMV Q-PCR Mix volume	20 µL	› Frequency of calibration	

G. Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Plasma	17 IU/mL – 57 gEq/mL	97% 58/60*	95% 54/57*

*confirmed samples/
tested samples

Matrix	Linearity (gEq/mL)	Linearity (IU/mL)	CF gEq/mL to IU/mL
Plasma	593 – 5x10⁶	178 – 1,5 x10⁷	0.3

H. Reference material tested

Panel name	Provider	Qualitative results	Quantitative results
Molecular Q Panel: CMVMQP01	Qnostics	Concordance 100% (4/4)*	Titre as expected value ± 0.5 log
QCMD 2017: CMVDNA17-S	Qnostics	Concordance 100% (10/10)*	Titre as expected value ± 0.5 log**

*confirmed samples/ tested samples **within the range of quantification

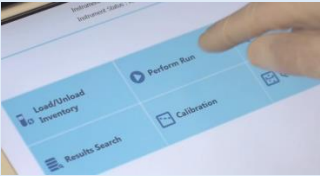
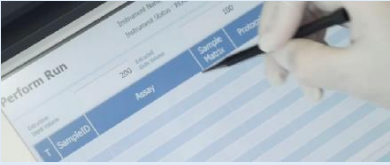

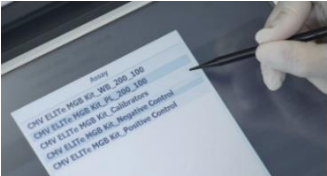

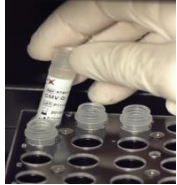



I. Procedures

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

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

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

<p>1. Select "Perform Run" on the touch screen</p> 	<p>2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elute: "100 µL"</p> 	<p>3. Scan the sample barcodes with handheld barcode reader or type the sample ID</p> 
<p>4. Select the "Assay protocol" of interest</p> 	<p>5. Select the sample position: Primary tube or sonication tube</p> 	<p>6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in the inventory block</p> 
<p>7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, sonication tube and primary sample racks</p> 	<p>8. Close the door Start the run</p> 	<p>9. View, approve and store the results</p> 

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

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

CMV ELITE MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Ref: RTK015PLD



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 CMV ELITE MGB Kit is a Real-Time PCR assay for the detection and quantification of the DNA of **Human Cytomegalovirus (CMV)**. The assay is CE-IVD validated in combination with **ABI PCR thermal cyclers** (Thermo-Fisher) and the following extraction systems: **ELITE STAR** (ELITechGroup), **ELITE GALAXY** (ELITechGroup), **easyMAG** (BioMérieux) or **QIASymphony** (Qiagen).

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
	CMV MIEA gene (Exon 4 region)	FAM
Internal Control	human beta Globin gene	VIC

C. Validated matrix

› **Whole blood** EDTA › **Plasma** EDTA › **Cerebrospinal fluid** › **Urine**

D. Kit Components

CMV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 100
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> › 7500 Fast Dx and 7300 PCR Instrument › ELITE STAR: INT010 › ELITE STAR 200 extraction kit: INT011EX › ELITE GALAXY: INT020 › ELITE GALAXY 300 extraction kit: INT021EX › CPE - Internal Control: CTCRPE | <ul style="list-style-type: none"> › CMV – ELITE Positive Control: CTR015PLD › CMV ELITE Standard: STD015PLD › easyMAG - Generic protocol 2.0.1 › QIASymphony - DNA Mini kit or DSP Virus/Pathogen Midi kit › Molecular biology grade water |
|--|---|

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ELITE STAR - ABI	Whole blood	263 IU/mL - 332 gEq/mL	100% (57/60)*	100% (63/70)*
	Plasma	222 IU/mL - 201 gEq/mL	97.1% (66/68)*	100% (61/61)*
ELITE GALAXY - ABI	Whole blood	127 IU/mL - 249 gEq/mL	98.3% (59/60)*	100% (65/66)*
	Plasma	140 IU/mL - 519 gEq/mL	92.2% (47/51)*	100% (64/64)*
easyMAG - ABI	Whole blood	-	100% (50/50)*	100% (50/50)*
	Cerebrospinal fluid	-	100% (60/60)*	100% (60/60)*
	Urine	-	100% (52/52)*	98.2% (55/56)*
QIASymphony - ABI	Whole blood	-	100% (60/60)*	98.3% (59/60)*
	Plasma	-	100% (60/60)*	98.3% (59/60)*

*confirmed samples/tested samples

System	Linearity (IU/mL)	Conversion factor gEq/reaction to gEq/mL	Conversion factor gEq/mL to IU/mL
ELITE STAR - ABI	221 → 22 x 10 ⁶ (WB), 308 → 30.8 x 10 ⁶ (PL)	28 (WB,PL)	0.79 (WB), 1.10 (PL)
ELITE GALAXY - ABI	178 → 17.8 x 10 ⁶ (WB), 105 → 10 x 10 ⁶ (PL)	35 (WB,PL)	0.51 (WB), 0.27 (PL)
easyMAG - ABI	305 → 30.5 x 10 ⁶ (WB)	50 (WB), 10 (CSF, Urine)	0.61 (WB)
QIASymphony - ABI	110 → 11 x 10 ⁶ (WB), 104 → 10 x 10 ⁶ (PL)	24 (WB), 12 (PL)	0.46 (WB), 0.87 (PL)

G. Procedure

The procedure below summarized the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELITe Star	WB, Plasma	200 µL	700 µL	100 µL	200 µL for 12 samples
ELITe Galaxy	WB, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	WB	100 µL	-	50 µL	-
	CSF, Urine	500 µL	-	100 µL	5 µL
QIASymphony	WB	200 µL	300 µL	60 µL	-
	Plasma	500 µL	600 µL	85 µL	6 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

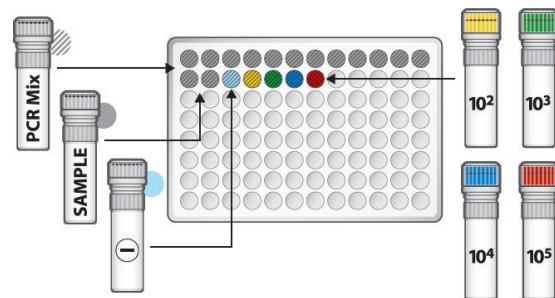
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "CMV" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C

Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
	72°C	20 sec

The melt curve analysis is optional, refer to the complete IFU

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw CMV Q-PCR-Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet 20 µL of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add, 20 µL of extracted DNA in sample wells, 20 µL of molecular grade water in Negative Control well, and 20 µL of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification - Threshold for qualitative analysis

Instrument	CMV FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	0.1	0.05

Interpretation - Qualitative results

CMV Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	-	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The CMV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction.

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ gEq/reaction or approximately from 100 to 10⁷ gEq/mL.

CMV ELITE MGB® Kit used with Cobas Z 480 PCR instrument

Ref: RTK015PLD



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 CMV ELITE MGB Kit is a Real-Time PCR assay for the detection and quantification of the DNA of **Human Cytomegalovirus (CMV)**. The assay is CE-IVD validated in combination with **Cobas Z 480 analyzer** (Roche) and the following extraction systems: **MagNA Pure 24 System**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
	CMV MIEA gene (Exon 4 region)	FAM
Internal Control	human beta Globin gene	VIC

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA › Plasma EDTA › Urine

D. Kit Components

CMV Q-PCR Mix

4 tubes of 540 µL



X 4

Ready to use complete reaction mixture
Number of tests per kit: 100
Freeze and thaw cycles per tube: 5
Maximum shelf-life: 24 months
Storage temperature: -20°C

E. Material required not provided in the kit

- › Cobas Z 480 analyzer PCR Instrument
- › MagNA Pure 24 System
- › CMV – ELITE Positive Control:CTR015PLD
- › CMV – ELITE Positive Control RF:CTR015PLD-R
- › CMV ELITE Standard:STD015PLD
- › CPE - Internal Control: CTCRPE
- › Molecular biology grade water

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole blood	135 IU/mL 270 gEq/mL	100% (51/51)*	98% (52/53)*
	Plasma	88 IU/mL - 220 gEq/mL	98% (62/63)*	96% (48/50)*
	Urine	296 IU/mL - 269 gEq/mL	98% (50/51)*	100% (49/49)*

*confirmed samples/tested samples

System	Matrix	Linearity (IU/mL)	Conversion factor gEq/reaction to gEq/mL	Conversion factor gEq/mL to IU/mL
MagNA Pure 24	Whole blood	178 IU/mL -> 10⁶ IU/mL		0.5
	Plasma	100 IU/mL -> 10⁶ IU/mL	25 (WB, PL, Urine)	0.4
	Urine	10³ IU/mL -> 10⁶ IU/mL		1.1

G. Procedure

The procedure below summarized the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
MagNA Pure 24	WB PL, Urine	200 µL	350 µL	100 µL	20 µL Diluted 1:2

Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments

1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "CMV" detector with "FAM" and quencher "465-510"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "540-580"

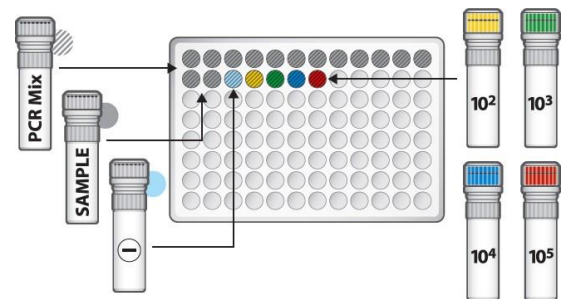
Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
45 cycles	72°C	20 sec

acquisition must be set during hybridization step at 60°C

The melt curve analysis is optional, refer to the complete IFU

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw CMV Q PCR-Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet 20 µL of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add 20 µL of extracted DNA in sample wells, 20 µL of molecular grade water in Negative Control well, and 20 µL of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification - Threshold for qualitative analysis

Instrument	Matrix	CMV FAM	Internal Control VIC
Cobas – Z 480	WB	0.80	1.5
	Plasma	0.55	1.2
	Urine	0.55	1.2

Interpretation - Qualitative results

CMV Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	-	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The CMV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction.

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ gEq/reaction or approximately from 250 to 2.5 10⁷ gEq/mL.