

NOTICE of CHANGE dated 28/10/2022

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«HSV2 ELITe MGB® Kit» Ref. RTS032PLD

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

- Update for the use of the product for CSF matrix in association with «ELITe BeGenius®» instrument (REF INT040);
- Internal Control Ct cut-off update in association with «ELITe InGenius®» (REF INT030) and «ELITe BeGenius®» (REF INT040)

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

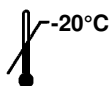
PLEASE NOTE

	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 KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT

HSV2 ELITE MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS032PLD



ÍNDICE

UTILIZAÇÃO PREVISTA

PRINCÍPIOS DO ENSAIO

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

AVISOS E PRECAUÇÕES

ELITE InGenius

AMOSTRAS E CONTROLOS

PROCEDIMENTO

ELITE BeGenius

AMOSTRAS E CONTROLOS

PROCEDIMENTO

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DO ELITE InGenius e ELITE BeGenius

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

AMOSTRAS E CONTROLOS

PROCEDIMENTO

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Roche cobas z 480 analyzer

AMOSTRAS E CONTROLOS

PROCEDIMENTO

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

REFERÊNCIAS

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

SÍMBOLOS

NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA

página 2
página 2
página 3
página 3
página 3
página 3
página 5

página 6
página 6
página 8
página 16
página 16
página 17
página 23

página 33
página 33
página 35
página 44

página 49
página 49
página 50
página 55

página 57
página 58
página 59
página 61
página 62

HSV2 ELITE MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS032PLD

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto «HSV2 ELITE MGB® Kit» faz parte de um ensaio qualitativo e quantitativo da amplificação de ácidos nucleicos para a **deteção e quantificação do ADN do vírus humano herpes Simples tipo 2 (HSV2)** em amostras de ADN extraídas do líquido cefalorraquidiano (LCR), sangue total colhido em EDTA e plasma colhido em EDTA.

O produto destina-se para utilização no diagnóstico e monitorização de infeções de HSV2, junto com dados clínicos do doente e outros resultados de testes de laboratório.

PRINCÍPIOS DO ENSAIO

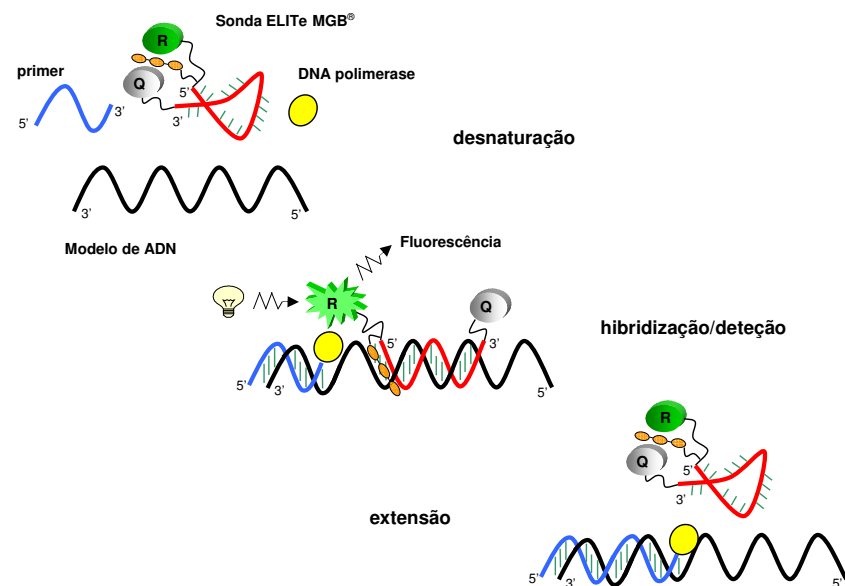
O ensaio consiste numa reação de amplificação em tempo real com um termóstato programável fornecido com um sistema ótico de deteção de fluorescência (termociclador de amplificação em tempo real).

Em cada furo, são realizadas duas reações de amplificação a partir do ADN extraído das amostras a serem testadas: uma reação específica para uma região da **glicoproteína G (gpG)** do HSV2 e uma reação específica para uma região do **gene da betaglobina humana** (Controlo Interno da inibição). A sonda específica do HSV2 com tecnologia ELITE MGB®, etiquetada com fluoróforo FAM, é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação do HSV2. A sonda específica do Controlo Interno com tecnologia ELITE MGB®, etiquetada com fluoróforo AP525 (semelhante a VCI), é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação para o 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 HSV2 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 descritos nestas instruções de utilização.

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.



DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto «**HSV2 ELITe MGB Kit**» fornece a mistura completa **pronta a usar** «**HSV2 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** 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 HSV2 (estabilizado pelo grupo MGB®, etiquetado com fluoróforo FAM e extinto por uma molécula não fluorescente) são específicos para uma região do **gpG** de HSV2 (região US4).

Os primários e a sonda para o Controlo Interno (estabilizado com o grupo MGB®, etiquetado por 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 «ELITe BeGenius»**, incluindo standards e controlos.

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

MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
HSV2 Q - PCR Mix	Mistura de reação completa	4 x 540 µL	-

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- 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 positive control da extração, o positive control da amplificação, os standards de ADN de quantidade conhecida e os consumíveis **não estão** incluídos neste produto.

Para uma 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), 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 «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, ref. TF-350-L-R-S).

Para a extração de ADN automática, a amplificação em tempo real e a interpretação da amostra a ser analisada, 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 «**HSV2 ELITe STD**»,
- para o Positive Control da amplificação «**HSV2 ELITe PC**»,
- para o Negative Control da amplificação «**HSV2 ELITe NC**»,
- para a análise de amostras «**HVS2 ELITe_WB_200_100**», «**HSV2 ELITe_PL_200_100** » e «**HSV2 ELITe_CSF_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 em tempo real e a interpretação da amostra a ser analisada, 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 «**HSV2 ELITe_Be STD**»,
- para o Positive Control da amplificação «**HSV2 ELITe_Be PC**»,
- para o Negative Control da amplificação «**HSV2 ELITe_Be NC**»,
- para a análise de amostras «**HSV2 ELITe_Be_WB_200_100**», «**HSV2 ELITe_Be_PL_200_100**» e «**HSV2 ELITe_Be_CSF_200_100**».

Para extração de ADN automática das amostras a serem analisadas, é validada a utilização do produto genérico «**ELITe STAR 200 Extraction kit**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT011EX), kit para extração de ADN e ARN de amostras não celulares e celulares, 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 do ADN e ARN de amostras não celulares e celulares com o instrumento «**ELITe GALAXY**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT020).

Para extração de ADN automática de amostras a serem analisadas, é válida a utilização de 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 «**QIAasymphony® DNA Mini Kit**» (QIAGEN GmbH, ref. 931236) e «**QIAasymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit**» (QIAGEN GmbH, ref. 937055), kits para extração de ácido nucleico de amostras biológicas, com o instrumento «**QIAasymphony® 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.

Como positive control 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 ADN de plasmídeo e o ARN genómico do fago MS2.

Quando for usado um 7300 Real-Time PCR System, é necessário usar o produto genérico «**MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate**» (Life Technologies, ref. N8010560), microplacas com poços de 0,2 mL e folhas vedantes adesivas para a amplificação em tempo real.

Quando for usado um 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, é necessário o uso do produto genérico: «**MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL**» (Life Technologies, ref. 4346906), microplacas com poços 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 HSV2 para análise qualitativa, use o produto «HSV2 - ELITe Positive Control» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR032PLD) ou o produto «HSV2 - ELITe Positive Control RF» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR032PLD-R), controlo positivo de ADN de plasmídeo.

Se for necessária a detecção e quantificação de ADN de HSV2 para análise quantitativa, use o produto «HSV2 ELITe Standard» (ELITechGroup S.p.A., ref. STD032PLD), quatro diluições de ADN de plasmídeo de quantidade conhecida para obter a curva standard.

AVISOS E PRECAUÇÕES

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

Avisos e precauções gerais

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

Manuseie e elimine todos os reagentes e todos os materiais usados na realização do ensaio como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite o contacto direto com os reagentes. Evite salpicos ou vaporizações. Os resíduos devem ser manuseados e eliminados em conformidade com as normas de segurança adequadas. Os materiais combustíveis descartáveis devem ser incinerados. Os desperdícios líquidos que contêm 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 ácido nucleico, 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 separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/detecção 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/detecção de produtos de amplificação. Nunca transfira batas, luvas ou ferramentas de laboratório da área designada para a amplificação/detecção 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. 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 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 HSV2 Q - PCR Mix deve ser guardada a -20 °C num local escuro.

A HSV2 Q - PCR Mix deve ser utilizada no prazo de um mês após a primeira abertura.

A HSV2 Q - PCR Mix pode ser congelada e descongelada num máximo de **cinco vezes**: quaisquer ciclos de congelação/descongelação adicionais podem causar um menor desempenho do produto.

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 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 a extração de ADN de 200 µL de sangue total for realizada com o **ELITe InGenius** e com o **ELITe InGenius Software** versão 1.3 (ou versões equivalentes mais recentes), use o protocolo de extração **HSV2 ELITe MGB ELITe_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 ácidos nucleicos 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 em alíquotas antes da congelação, para evitar ciclos repetidos de congelação e descongelação. Quando utilizar amostras congeladas, descongele as mesmas apenas imediatamente antes da extração, para evitar uma possível degradação do ácido nucleico.

Nota: quando a extração de ADN de 200 µL de plasma for realizada com o **ELITe InGenius** e com o **ELITe InGenius Software** versão 1.3 (ou versões equivalentes mais recentes), use o protocolo de extração **HSV2 ELITe_PL_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.

Líquido cefalorraquidiano (LCR)

As amostras de LCR 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. 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 LCR for realizada com o **ELITe InGenius** e o **ELITe InGeniusSoftware** versão 1.1 (ou versões equivalentes posteriores), utilize o protocolo de extração **HSV2 ELITe_CSF_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.

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.

Outras amostras

Neste momento não existem dados disponíveis relativos ao desempenho do produto com outras amostras clínicas, como sangue total: suspensões de leucócitos, suspensões de granulócitos, líquido amniótico.

Substâncias interferentes

A amostra não deve conter heparina, 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 imunossuppressores.

Calibradores da amplificação e controlos da amplificação

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

- como definição do calibrador, utilize os quatro níveis de concentração do **HSV2 ELITe Standard**, em associação com o protocolo «**HSV2 ELITe STD**»
- como controlo positivo da amplificação, use o **HSV2 - ELITe Positive Control** em associação com o protocolo «**HSV2 ELITe_PC**»
- como Controlo negativo da amplificação, use água de qualidade molecular (não fornecida com este kit) em associação com o protocolo «**HSV2 ELITe_NC**».

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

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

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

- for iniciado um novo lote de reagentes,
- 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

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

PROCEDIMENTO do ELITe InGenius

A utilização do «**HSV2 - 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 (**HSV2 Q - PCR Standard**) foram executados, aprovados e não estão expirados (estado). Pode verificar esta situação no menu «Calibração» na página inicial;
- verificar se os controlos da amplificação (**HSV2 - Positive Control**, **HSV2 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 ELITeGroup. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os kits **ELITe MGB**, matrizes e o instrumento **ELITe InGenius**.

Os protocolos de ensaio disponíveis para teste da amostra com o produto «**HSV2 ELITe MGB Kit**» estão descritos na tabela seguinte.

Protocolos de ensaio para o HSV2 ELITe MGB Kit			
Nome	Matriz	Unidade do relatório	Características
HSV2 ELITe MGB kit_WB_200_100	Sangue Total	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicção: NÃO Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
HSV2 ELITe MGB kit_PL_200_100	Plasma	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicção: NÃO Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
HSV2 ELITe MGB kit_CSF_200_100	LCR	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicção: NÃO 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 ELITeGroup na sua localidade.

Os protocolos para análise qualitativa estão disponíveis a pedido.

Preparação da sessão

- O **HSV2 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 execução de Positive e Negative Control (PCR only) (apenas PCR).

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

Nota: o ELITe InGenius pode ser ligado ao “Sistema de Informações Laboratoriais” (LIS), que permite carregar as informações da sessão. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

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

A. Execução integrada

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

- Aqueça as amostras até à temperatura ambiente (~+25 °C) e manuseie-as de acordo com as diretrizes laboratoriais e com a secção “Amostras e Controlos”.
- Descongele os tubos da HSV2 Q - PCR Mix 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: Proteja a HSV2 Q - PCR Mix da luz enquanto descongela, dado que este reagente é fotossensível.

- Descongele os 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”.
- Certifique-se de que o Volume de entrada de extração é de 200 µL e que o Volume de eluição extraído é de 100 µL.
- Para cada Rastreio 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, HSV2 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 “Tubo primário”,
se for usado um tubo secundário, selecione “Sonication Tube” (Tubo de sonicação).
Clique em “Next” para continuar a preparação.
- Carregue a CPE e a Mistura HSV2 Q-PCR no “Bloco de inventário” selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique no botão “Next” para continuar a preparação.
- Carregue e verifique os Suportes de pontas na “Inventory Area” (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique no botão “Next” para continuar a preparação.
- Carregue as “PCR Cassettes”, os cartuchos de extração “ELITe InGenius SP 200”, 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.

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

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

Nota: No final da execução, as PCR Cassettes com os produtos de reação e os outros consumíveis têm de ser eliminados em conformidade com todos os regulamentos governamentais e ambientais seguintes. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: No final da execução, a mistura de PCR pode ser mantida no bloco refrigerado durante até 16 horas.

B. Execução da amplificação

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

- Descongele um número suficiente de tubos da HSV2 Q - PCR Mix 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: Proteja a HSV2 Q - PCR Mix da luz enquanto descongela, dado que este reagente é fotossensível.

- Selecione “Perform Run” a partir do ecrã “Home screen”.
- Certifique-se de que o Volume de entrada de extração é de 200 µL e que o Volume de eluição extraído é de 100 µL.
- Para cada Rastreio de interesse introduza 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, HSV2 ELITe_WB_200_100).
- Selecione “PCR Only” (apenas PCR) na coluna “Protocol”.
- Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra eluída na coluna “Sample Position” é “ExtraTube (fila inferior)”. Clique em “Next” para continuar a preparação.
- Carregue a HSV2 Q-PCR Mix no Inventory Block selecionado seguindo as instruções da 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 as “PCR Cassettes” e as amostras de Ácido nucleico extraídas seguindo as instruções na GUI. Clique em “Next” para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione “Start” para iniciar a execução.

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

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

Nota: No final da execução, as PCR Cassettes e os consumíveis têm de ser eliminados em conformidade com todos os regulamentos governamentais e ambientais seguintes. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: No final da execução, a mistura de PCR pode ser mantida no bloco refrigerado durante até 16 horas.

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 HSV2 Q - PCR Mix 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: Proteja a HSV2 Q - PCR Mix da luz enquanto descongela, dado que este reagente é fotossensível.

2. Descongele os tubos HSV2 Q - PCR Standard (Cal1: HSV2 Q-PCR Standards 10², Cal2: HSV2 Q-PCR Standards 10³, Cal3: HSV2 Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: HSV2 Q - PCR Standards 10⁵). 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. Certifique-se de que o Volume de entrada de extração é de 200 µL e que o Volume de eluição extraído é de 100 µL.
5. Começando a partir do Rastreo de interesse, selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Ensaio" (HSV2 ELITe_STD) e preencha com o número do lote e a data de expiração para o HSV2 Q - PCR Standard. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
6. Carregue a HSV2 Q-PCR Mix no Inventory Block 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 do Calibrador e as PCR Cassettes, 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 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: Os Calibradores podem ser usados para 4 sessões separadas de 3 horas cada.

Nota: No final da execução, as PCR Cassetes e os outros consumíveis têm de ser eliminados em conformidade com todos os regulamentos governamentais e ambientais seguintes. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: No final da execução, a mistura de PCR pode ser mantida no bloco refrigerado durante até 16 horas.

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 um número suficiente de tubos da HSV2 Q - PCR Mix 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: Proteja a HSV2 Q - PCR Mix da luz enquanto descongela, dado que este reagente é fotossensível.

2. Descongele o produto HSV2 - Positive Control, para amplificação de 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. No Rastreo de interesse, selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay".
6. Para o positive control, selecione o HSV2 ELITe_PC para o positive control e preencha o número do lote e a data de validade do HSV2 Positive Control.
7. Para o negative control, selecione HSV2 ELITe_NC 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 HSV2 Q-PCR Mix no Inventory Block selecionado seguindo as instruções da 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 as PCR Cassete da amplificação, o Positive Control e/ou o 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 ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: O Controlo positivo deve ser executado como controlo da amplificação, para preparar o Gráfico de controlo. São necessários quatro (4) valores de Controlo positivo, de 4 execuções diferentes, para preparar o gráfico. Após isso, os valores do Controlo positivo são usados para monitorização do passo de amplificação. Consulte o manual do utilizador do instrumento para obter mais informações.

Nota: No final da execução, o restante Controlo positivo pode ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: O Controlo Positivo pode ser usado para 4 sessões separadas de 3 horas cada.

Nota: No final da execução, as PCR Cassetes e os outros consumíveis têm de ser eliminados em conformidade com todos os regulamentos governamentais e ambientais seguintes. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: A PCR mix pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 16 horas.

Revisão e aprovação de resultados

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

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

Nota: O **ELITe InGenius** pode ser ligado ao "Sistema de Informações Laboratoriais" (LIS), que permite carregar os resultados da sessão no centro de dados laboratoriais. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

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

O **ELITe InGenius** gera os resultados utilizando o «**HSV2 ELITe MGB Kit**» através do seguinte procedimento:

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

A. Validação da Curva de calibração

O **ELITe InGenius software** interpreta os resultados da PCR para a sonda específica de HSV2 ("HSV2") e sonda de controlo interno específica ("CI") na reação de amplificação dos calibradores com os parâmetros do protocolo de ensaio do HSV2 ELITe_STD. Os valores de Ct resultantes são usados para validar o sistema (lote de reagentes e instrumento).

A Curva de calibração, específica para o lote do reagente de amplificação, é guardada na base de dados após a aprovação pelo "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 "Failed" no ecrã "Calibration". Neste caso, os resultados não podem ser aprovados e têm de ser repetidas as reações de amplificação do Calibrador.

Nota: Quando a Curva de calibração for executada 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.

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

O **ELITe InGenius software** interpreta os resultados da PCR para a sonda específica de HSV2 ("HSV2") e sonda de controlo interno específica ("CI") na reação de amplificação do positive control e negative control com os parâmetros do protocolo de ensaio HSV2 ELITe_PC e HSV2 ELITe_NC. Os valores de Ct resultantes são usados para validar o sistema (lote de reagentes e instrumento).

Os resultados do Controlo positivo e Controlo negativo da amplificação, específicos para o lote do reagente de amplificação, são guardados na base de dados (Controlos) após a aprovação pelo "Administrador" ou "Analista" seguindo as instruções na GUI.

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

Os resultados do positive control da amplificação, específicos para o lote de reagente de amplificação, irão expirar **após 15 dias**.

Antes da análise de qualquer amostra e após a aprovação da Curva de calibração, é absolutamente obrigatório gerar e aprovar os resultados de Controlo positivo e Controlo negativo de uma amplificação para o lote de reagente da amplificação usado. A disponibilidade de resultados de Controlo positivo e Controlo negativo de uma amplificação com "Aprovado" (Estado) é mostrada na janela "Controlos" do software ELITe InGenius. Se os resultados do Controlo positivo e Controlo negativo da amplificação estiverem em falta, crie os mesmos da forma acima descrita.

O **ELITe InGenius software** processa os resultados do positive control e do negative control e gera os Gráficos de Controlo. São usados quatro resultados de Controlo Positivo e do Controlo Negativo aprovados para preparar o "Gráfico de controlo" inicial. Para controlos posteriores, os resultados são analisados pelo software para garantir que os desempenhos do sistema se encontram dentro dos critérios de aceitação, mostrados nos gráficos Gráfico de Controlo. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

Nota: Se o resultado do Controlo Positivo e do Controlo Negativo não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem "Failed" no ecrã "Controls". Neste caso, os resultados não podem ser aprovados e as execuções de positive control e do negative control têm de ser repetidas.

Nota: Se o positive control e o negative control forem inválidos e as amostras tiverem sido incluídas na mesma execução, as amostras podem ser aprovadas mas os resultados não são válidos. Neste caso, o controlo(s) falhado e as amostras têm de ser todos repetidos.

C. Validação dos resultados das amostras

O ELITe InGenius software interpreta os resultados da PCR para a sonda HSV2 (canal "HSV2") e a sonda de Controlo Interno (Canal "IC") com os parâmetros do protocolo do ensaio HSV2 ELITe_WB_200_100, HSV2 ELITe_PL_200_100 e HSV2 ELITe_CSF_200_100. Os valores da Ct do HSV2 resultante são convertidos em concentração.

Os resultados estão mostrados no módulo "Result Display".

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

1) Curva de calibração	Estado
HSV2 Q - PCR Standard	APROVADO
2) Positive Control	Estado
HSV2 - Positive Control	APROVADO
3) Negative Control	Estado
HSV2 - Negative Control	APROVADO

Os resultados da amostra são automaticamente interpretados pelo ELITe InGenius software usando os parâmetros do protocolo do ensaio. Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado.

Resultado da execução da amostra	Interpretação
HSV2: ADN detetado, quantidade igual a XXX cópias/mL	ADN HSV2 detetado no intervalo de medição do ensaio, quantidade como mostrado.
HSV2: ADN detetado, quantidade inferior a LLoQ cópias/mL	ADN HSV2 detetado abaixo do limite inferior de quantificação do ensaio
HSV2: ADN detetado, quantidade além de ULoQ cópias/mL	ADN HSV2 detetado além do limite superior de quantificação do ensaio
HSV2: ADN não detetado ou inferior a LoD cópias/mL	Não foi detetado ADN de HSV2 na amostra. A amostra é negativa para ADN de HSV2 ou a sua concentração está abaixo do limite de deteção do ensaio.
Inválido - Voltar a testar a amostra	Resultado do ensaio inválido devido a falha do Controlo Interno (extração incorreta, transferência de inibidores). O teste deve ser repetido.

Amostras reportadas como "HSV2: ADN detetado, quantidade abaixo do LIdQ" não são adequadas para quantificação. A concentração de ADN de HSV2 detetada na amostra é inferior ao nível a que pode ser quantificada com exatidão. Se a amostra tiver sido diluída antes da extração ou PCR, pode ser novamente testada sem diluição.

HSV2 ELITe MGB® Kitreagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS032PLD

Amostras reportadas como "HSV2: ADN detetado, quantidade acima do LSdQ" não são adequadas para quantificação. A concentração de ADN de HSV2 detetada na amostra é superior ao nível a que pode ser quantificada com exatidão. A amostra pode ser diluída antes da extração ou PCR e novamente testada de forma a serem obtidos resultados dentro do intervalo linear do ensaio.

As amostras reportadas como "ADN de HSV2 não detetado ou abaixo do LdD" são adequadas para análise mas não foi detetado ADN de HSV2. Neste caso, a amostra pode ser negativa para ADN de HSV2 ou o ADN de HSV2 está presente numa concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver "Características de desempenho").

As amostras positivas para ADN de HSV2 a uma concentração inferior ao LdD, são comunicadas como "HSV2: ADN detetado, quantidade inferior ao LLoQ" (consulte "Características de desempenho").

As amostras reportadas como "Invalid - Retest Sample" não são adequadas para a interpretação dos resultados. Neste caso, o ADN do Controlo Interno não foi detetado eficientemente devido a problemas no passo de PCR ou extração (degradação ou perda do ADN durante a extração ou inibidores na eluição), que pode causar resultados incorretos.

Se subsistir volume da eluição suficiente, o eluato pode ser novamente testado (tal como está ou diluído) através de uma execução da amplificação no modo "PCR Only" (apenas PCR). Se o segundo resultado for inválido, a amostra deve ser novamente testada começando a partir da extração de uma nova amostra utilizando o modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

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 exportados 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 um rastreio de execução da amostra pelo rastreio selecionado.

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

HSV2 ELITe MGB® Kitreagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS032PLD

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 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 a extração de ADN de 200 µL de sangue total for realizada com o **ELITe BeGenius** e com o **ELITe BeGenius Software** versão **2.0** (ou versões equivalentes mais recentes), use o protocolo de extração **HSV2 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 ácidos nucleicos 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 em alíquotas antes da congelação, para evitar ciclos repetidos de congelação e descongelação. Quando utilizar amostras congeladas, descongele as mesmas apenas imediatamente antes da extração, para evitar uma possível degradação do ácido nucleico.

Nota: quando a extração de ADN de 200 µL de plasma for realizada com o **ELITe BeGenius** e com o **ELITe BeGenius Software** versão **2.0** (ou versões equivalentes mais recentes), use o protocolo de extração **HSV2 ELITe Be_PL_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.

Líquido cefalorraquidiano (LCR)

As amostras de LCR 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. 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 LCR for realizada com o **ELITe BeGenius** e o **Software ELITe BeGenius** versão **2.0.0** (ou versões equivalentes posteriores), utilize os protocolos de extração **HSV2 ELITe Be_CSF_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.

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.

Outras amostras:

Neste momento não existem dados disponíveis relativos ao desempenho do produto com outras amostras clínicas, como sangue total: suspensões de leucócitos, suspensões de granulócitos e líquido amniótico.

Substâncias interferentes

A amostra não deve conter heparina, 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 imunossuppressores.

Calibradores da amplificação e controlos da amplificação

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

como definição do calibrador, utilize os quatro níveis de concentração do **HSV2 ELITe Standard**, em associação com o protocolo «**HSV2 ELITe_Be_STD**»

como controlo positivo da amplificação, use o **Controlo positivo HSV2 - ELITe** em associação com o protocolo «**HSV2 ELITe_Be_PC**»

como Controlo negativo da amplificação, use água de qualidade molecular (não fornecida com este kit) em associação com o protocolo «**HSV2 ELITe_Be_NC**».

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

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

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

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

Controlos da qualidade

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

PROCEDIMENTO do ELITe BeGenius

A utilização do «**HSV2 - 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 (**HSV2 Q-PCR Standard**) foram executados, aprovados e não estão expirados (estado). Pode verificar esta situação no menu «Calibração» na página inicial;
- verificar se os controlos da amplificação (**HSV2 - Positive Control**, **HSV2 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 BeGenius**.

Os Protocolos de ensaio disponíveis para o «**HSV2 ELITe MGB Kit**» estão descritos na tabela seguinte.

Protocolos de ensaio para o « HSV2 ELITe MGB Kit » e o ELITe InGenius			
Nome	Matriz	Unidade relatório do	Características
HSV2 ELITe_Be_PL_200_100	Plasma	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
HSV2 ELITe_Be_WB_200_100	Sangue Total	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
HSV2 ELITe_Be_CSF_200_100	LCR	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Internal Control: 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.

Preparação da sessão

O **HSV2 ELITe MGB Kit** pode ser usado no **ELITe BeGenius** para realizar:

- Execução da amostra, (EXTR + PCR),
- Execução de amplificação (PCR only),
- Execução da calibração (PCR Only) (apenas PCR),
- Execução de amplificação para execução de 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 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 integrada

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

1. Descongele um número suficiente de tubos da HSV2 Q - PCR Mix 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 o **HSV2 PCR Mix** num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

2. Descongele um número suficiente de tubos CPE para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para 12 extrações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
4. Retire os Suportes da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
5. Selecione o "run mode": "Extract + PCR" (Extração + PCR).
6. Carregue as amostras na área de refrigeração a partir do Suporte de amostras L5.
7. Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.

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

8. Verifique o Volume de entrada de extração (200 µL) e o Volume de eluição extraído (100 µL).
9. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (isto é, HSV2 ELITe_Be_PL_200_100). Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Se for realizada uma segunda extração, repita os passos 6 a 9 utilizando o suporte de amostras L4.
11. Carregue os tubos de eluição com código de barras na área de refrigeração, a partir do suporte de eluição L3.

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

12. Insira o suporte de eluição L3 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
13. Repita os passos 11 e 12 utilizando o Suporte de reagente/eluição L2.
14. Carregue o CPE e a HSV2 Q-PCR Mix na área de refrigeração.
15. Insira o suporte de reagente L1 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
16. 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.
17. Carregue o Suporte de PCR com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
18. Carregue o Suporte de extração 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.
19. Feche a porta do instrumento.
20. 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:

1. Descongele um número suficiente de tubos da HSV2 Q - PCR Mix 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 o **HSV2 PCR Mix** num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

2. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
3. Retire os Suportes 1, 2 e 3 da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
4. Selecione o "run mode": "PCR Only".
5. Carregue as amostras na área de refrigeração a partir do Suporte de eluição L3.
6. Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
7. Mesmo que não seja efetuada a extração, verifique o Volume de entrada de extração (200 µL) e o Volume de eluição extraído (100 µL).
8. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (por ex., HSV2 ELITe_Be_PL_200_100). Clique em "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue a HSV2 Q-PCR Mix na área de refrigeração.
10. Insira o suporte 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 Suporte de PCR com "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 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 um número suficiente de tubos da HSV2 Q - PCR Mix 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 o **HSV2 PCR Mix** num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

- Descongele os tubos HSV2 Q - PCR Standard (Cal1: HSV2 Q-PCR Standards 10², Cal2: HSV2 Q-PCR Standards 10³, Cal3: HSV2 Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: HSV2 Q-PCR Standards 10⁵). Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- 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 os tubos do Calibrador no Suporte de eluição L3.
- 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" (HSV2 ELITe_Be_STD). Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a HSV2 Q-PCR Mix no L2 Reagent/Elution Rack.
- Insira o Suporte de reagente/eluição L2 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 Suporte de PCR 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, 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 amplificação para Controlo Positivo e Controlo Negativo

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

- Descongele um número suficiente de tubos da HSV2 Q - PCR Mix 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 o **HSV2 PCR Mix** num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

- Descongele o produto HSV2 - ELITe Positive Control, para amplificação de Positive Control. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Transfira pelo menos 50 µL da água de qualidade para biologia molecular (como Negative Control) para as sessões num tubo Eluição, fornecido com o ELITe InGenius SP Consumable Set.
- 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 os tubos de Positive Control e Negative Control no Suporte de eluição L3.
- 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., (HSV2 ELITe_Be_PC e HSV2 ELITe_Be_NC). Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a HSV2 Q-PCR Mix no L2 Reagent/Elution Rack.
- Insira o Suporte de reagente/eluição L2 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 Suporte de PCR 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, 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 HSV2 ELITe MGB Kit através do seguinte procedimento:

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

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

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO 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 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 24 réplicas a realizarem a amplificação por produtos ELITechGroup S.p.A. em dois instrumentos diferentes. Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
10 cópias de ADN de plasmídeo + 500 ng de ADN genómico humano	24	24	0

O Limite de deteção (LdD) do HSV2 ELITe MGB Kit foi verificado em associação com amostras de **Sangue total**, **Plasma colhidas em EDTA** e amostras de LCR em associação com os sistemas **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** (modo de extração + PCR).

Para sangue total

O LdD deste ensaio foi verificado através de testes a 20 réplicas de amostras de sangue total reforçadas com 171 cópias/mL nos sistemas **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** no modo "Extract + PCR". As amostras foram reforçadas com material de referência certificado "Líquido de cultura HSV tipo 2 inativado por calor" (ZeptoMetrix Corporation).

O LdD é confirmado se, pelo menos, 18 em 20 réplicas derem resultado positivo.

Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de sangue total e ELITe InGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
Sangue total colhido em EDTA	171 cópias/mL	20	20	20	0

Limite de deteção para amostras de sangue total e ELITe BeGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
Sangue total colhido em EDTA	171 cópias/mL	20	20	20	0

O valor de LoD para o alvo HSV2 foi confirmado a 171 IU/mL para sangue total colhido em EDTA.

Para Plasma

O LdD deste ensaio foi verificado através de testes a 20 réplicas de amostras de plasma reforçadas com 119 cópias/mL nos sistemas **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** no modo "Extract + PCR". As amostras foram reforçadas com material de referência certificado "Líquido de cultura HSV tipo 2 inativado por calor" (ZeptoMetrix Corporation).

O LdD é confirmado se, pelo menos, 18 em 20 réplicas derem resultado positivo.

Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de plasma e ELITe InGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
Plasma colhido em EDTA	119 cópias/mL	20	20	20	0

Limite de deteção para amostras de plasma e ELITe BeGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
Plasma colhido em EDTA	119 cópias/mL	20	20	20	0

O valor de LoD para o alvo HSV2 foi confirmado a 119 IU/mL para plasma colhido em EDTA.

Para o líquido cefalorraquidiano (LCR)

O LdD deste ensaio foi verificado através de testes a 20 réplicas de amostras de LCR reforçadas com 119 cópias/mL nos sistemas **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** no modo "Extract + PCR". As amostras foram reforçadas com material de referência, fluido de cultura inativado por calor de vírus de herpes simples tipo 2 (HSV-2) (ZeptoMetrix Corporation).

O LdD é confirmado se, pelo menos, 18 em 20 réplicas derem resultado positivo.

Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de LCR e ELITe InGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
Líquido cefalorraquidiano	119 cópias/mL	20	20	20	0

Limite de deteção para amostras de LCR e ELITe BeGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
Líquido cefalorraquidiano	119 cópias/mL	20	20	19	1

O valor do LdD para o alvo HSV2 foi confirmado a 119 IU/mL para líquido cefalorraquidiano.

Intervalo de medição linear e Limites de quantificação

O intervalo de medição linear do HSV2 ELITe MGB Kit usado em associação com **Sangue Total**, **Plasma colhidas em EDTA** e amostras de **LCR** em associação com o **ELITe InGenius** e o **ELITe BeGenius** foi verificado com um painel de diluições de HSV2. O painel foi preparado através da diluição de "Líquido de cultura de HSV Tipo 2 inativado por calor" (ZeptoMetrix Corporation) em matrizes negativas para ADN de HSV2.

reagente para amplificação em tempo real
do ADN

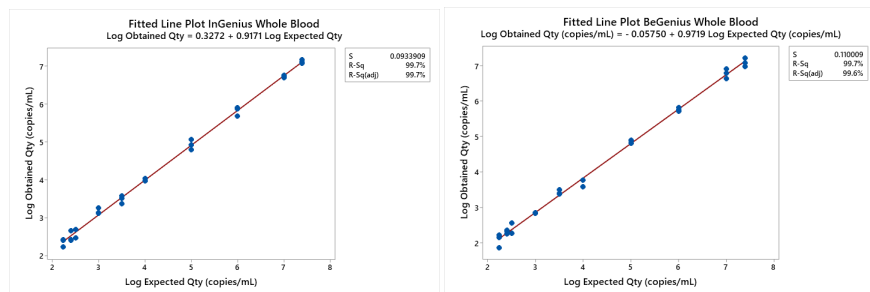
REF RTS032PLD

Para sangue total

O painel era constituído por dez pontos de diluição a partir de cerca de $2,5 \times 10^7$ cópias/mL a cerca de 171 cópias/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 sangue total, mostra uma resposta linear para todas as diluições com um coeficiente de correlação quadrado (R²) igual a 0,997 para o **ELITe InGenius** e 0,997 para o **ELITe BeGenius**.

Os resultados são comunicados nos gráficos seguintes.



O Limite inferior de quantificação (LLOQ) foi definido à concentração do LoD que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,1081 Registro cópias/mL para o **ELiTe InGenius** e 0,1900 Registro cópias/mL para o **ELiTe BeGenius**) e exatos (Bias igual a -0,1221 Registro cópias/mL para o **ELiTe InGenius** e 0,1591 Registro cópias/mL para o **ELiTe BeGenius**; 171 cópias/mL).

O Limite superior de quantificação (ULOQ) foi definido à concentração mais alta testada que forneceu resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,0472 Registro cópias/mL para o **ELiTE InGenius**, e 0,1191 Registro cópias/mL para o **ELiTE BeGenius**) e exatos (Bias igual a 0,2744 Registro cópias/mL para o **ELiTE InGenius** e 0,3029 Registro cópias/mL para o **ELiTE BeGenius**: 25.000.000 cópias/mL).

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

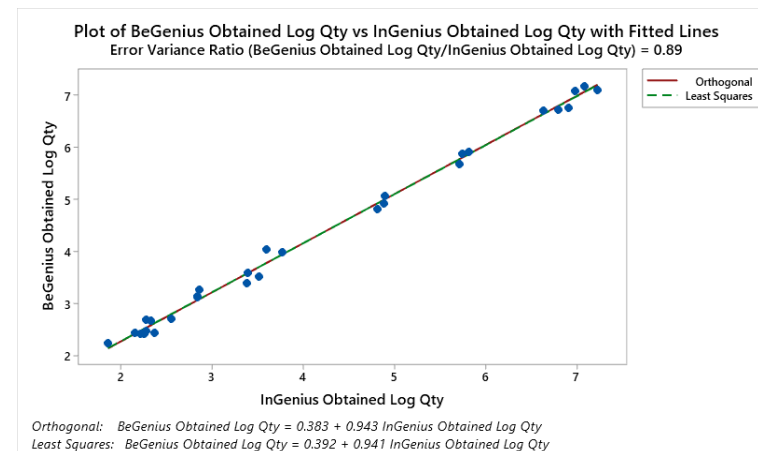
Intervalo de medição linear para amostras de Sangue Total e o ELite InGenius e ELite BeGenius		
Unidade de medida	limite inferior	limite superior
cópias/mL	171	25.000.000

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.

reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS032PLD

Os resultados estão resumidos na figura seguinte.



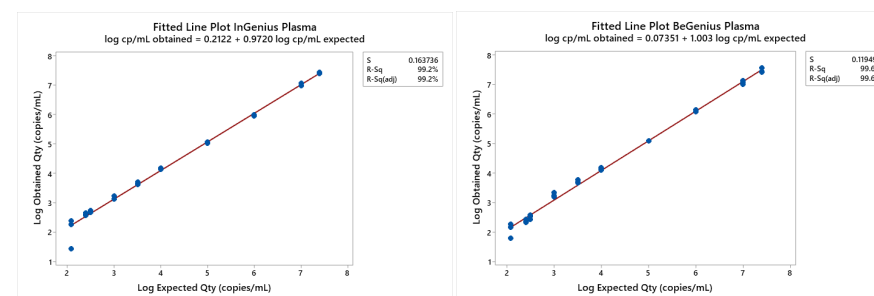
Neste teste, a análise da regressão ortogonal gerou um declive igual a 0,943 (95% CI: 0,919 - 0,967) e uma interceção igual a 0,383 (95% CI: 0,276 - 0,491). A análise de regressão linear gerou um R² de 0,996.

Para Plasma

O painel era constituído por dez pontos de diluição a partir de cerca de $2,5 \times 10^7$ cópias/mL a cerca de 119 cópias/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 sangue total, mostra uma resposta linear para todas as diluições com um coeficiente de correlação quadrado (R²) igual a 0,992 para o **ELITe InGenius** e 0,996 para o **ELITe BeGenius**.

Os resultados são comunicados nos gráficos seguintes.



O Limite inferior de quantificação (LLoQ) foi definido à concentração do LoD que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,2529 Registro cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,2931 Registro cópias/mL para o **ELITe BeGenius**) e exatos (Viés igual a 0,0503 Registro cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,0005 Registro cópias/mL para o **ELITe BeGenius**): 119 cópias/mL.

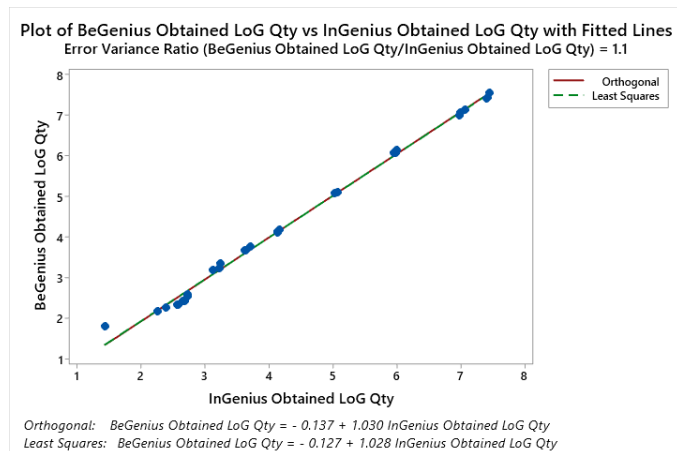
O Limite superior de quantificação (ULoQ) foi definido à concentração mais alta testada que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,0234 Registro cópias/mL para o **ELITE InGenius** e, 0,0761 Registro cópias/mL para o **ELITE BeGenius**) e exatos (Bias igual a -0,0258 Registro cópias/mL para o **ELITE InGenius** e -0,0646 Registro cópias/mL para o **ELITE BeGenius**): 25.000,00 cópias/mL.

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
cópias/mL	119	25.000.000

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.



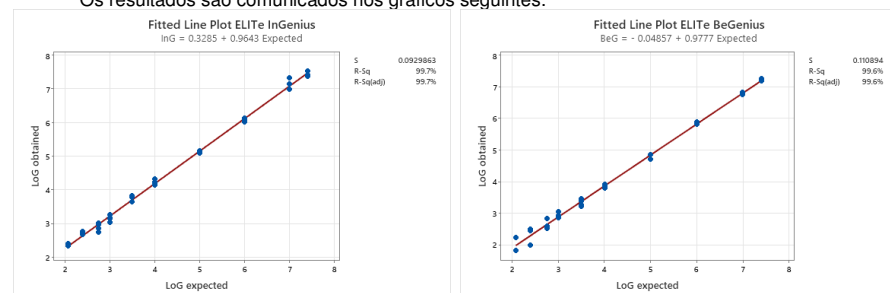
Neste teste, a análise da regressão ortogonal gerou um declive igual a 1,030 (95% CI: 1,005; 1,056) e uma interceção igual a -0,137 (95% CI: -0,257; -0,017). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0,996.

Para o líquido cefalorraquidiano LCR:

O painel era constituído por dez pontos de diluição a partir de cerca de $2,5 \times 10^7$ cópias/mL a cerca de 119 cópias/mL. Cada amostra do painel foi testada em 4 réplicas. Duas réplicas foram excluídas como valores atípicos.

A análise dos dados obtidos, realizada por análise da regressão linear, demonstrou que o ensaio, em associação com amostras de LCR, demonstra uma resposta linear para todas as diluições com um coeficiente de correlação quadrado (R2) igual a 0,997 para o **ELITe InGenius** e 0,996 para o **ELITe BeGenius**.

Os resultados são comunicados nos gráficos seguintes.



O Limite inferior de quantificação (LdQ) foi definido à concentração do LdD que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,0261 Log cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,2349 Log cópias/mL para o **ELITe BeGenius**) e exatos (viés igual a -0,2938 Log cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,1138 Log cópias/mL para o **ELITe BeGenius**): 119 cópias/mL.

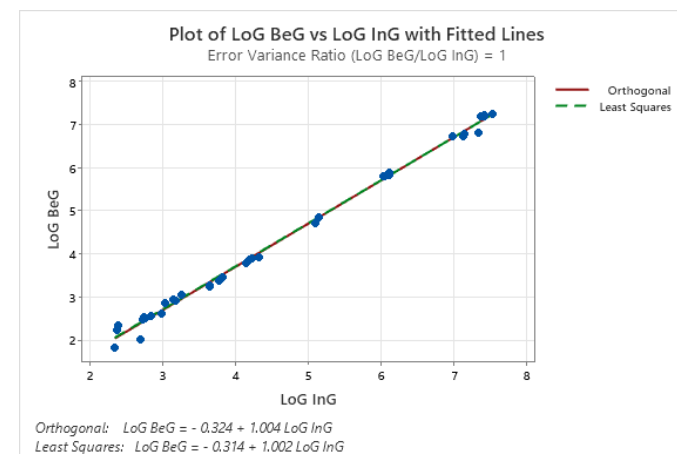
O limite superior de quantificação (LSdQ) foi definido à concentração mais alta testada que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,0637 Log cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,0277 Log cópias/mL para o **ELITe BeGenius**) e exatos (viés igual a -0,0345 Log cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,1823 Log cópias/mL para o **ELITe BeGenius**): 25.000.000 cópias/mL.

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear para amostras de LCR e o ELITe InGenius e ELITe BeGenius		
Unidade de medida	limite inferior	limite superior
cópias/mL	119	25.000.000

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 1,004 (95% CI: 0,9822; 1,0267) e uma interceção igual a 0,324 (95% CI: -0,4334; -0,2147). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0,995.

Repetibilidade

A Capacidade de repetição dos resultados obtidos pelo produto HSV2 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 HSV2 "Líquido de cultiva de HSV Tipo 2 inativado por calor (Zeptomatrix)" a uma concentração de 3 x LoD (cerca de 513 IU/mL) e de 10 x LoD (cerca de 1710 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.

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.

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	HSV2				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	22,91	0,51	2,24
3 x LoD	8 / 8	35,65	0,87	2,45				
10 x LoD	8 / 8	33,96	0,20	0,58				

Repetibilidade inter-sessão ELiTe InGenius								
Amostra	HSV2				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	23,40	0,82	3,49
3 x LoD	16 / 16	35,87	0,71	1,99				
10 x LoD	16 / 16	33,92	0,22	0,66				

No teste de Repetibilidade no **ELiTe InGenius**, o ensaio detetou o alvo HSV2 como esperado e mostrou valores de Ct com %CV abaixo de 5% para HSV2 e para o Controlo Interno.

A Repetibilidade intra-sessão no **ELiTe BeGenius** foi obtida através da análise de amostras do painel em oito réplicas, em uma execução por dia, com o mesmo lote do produto, no mesmo instrumento, no mesmo dia. As amostras foram processadas em posições aleatórias.

A Repetibilidade inter-sessão no **ELiTe BeGenius** foi obtida através da análise de amostras do painel em oito réplicas, em uma execução por dia, com o mesmo lote do produto, no mesmo instrumento, em dois dias diferentes. As amostras foram processadas em posições aleatórias.

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 BeGenius								
Amostra	HSV2				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	27,16	0,87	3,19
3 x LoD	8 / 8	37,58	0,67	1,78				
10 x LoD	8 / 8	35,25	0,56	1,58				

Repetibilidade inter-sessão ELiTe BeGenius								
Amostra	HSV2				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	26,87	0,94	3,49
3 x LoD	16 / 16	37,59	0,66	1,75				
10 x LoD	16 / 16	35,41	0,84	2,37				

No teste de Repetibilidade no **ELiTe BeGenius**, o ensaio detetou o alvo HSV2 como esperado e mostrou valores de Ct com %CV abaixo de 5% para HSV2 e para o Controlo Interno.

Capacidade de reprodução

A Capacidade de reprodução dos resultados obtidos pelo produto HSV2 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 HSV2 "Líquido de cultura de HSV Tipo 2 inativado por calor (Zseptometrix)" a uma concentração de 3 x LoD (cerca de 513 IU/mL) e de 10 x LoD (cerca de 1710 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, 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. 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	HSV2				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	23,91	0,35	1,45
3 x LoD	8 / 8	36,33	0,55	1,51				
10 x LoD	8 / 8	34,46	0,26	0,86				

Capacidade de repetição inter-lote ELiTe InGenius								
Amostra	HSV2				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	0,42	1,76
3 x LoD	8 / 8	36,45	0,46	1,26				
10 x LoD	8 / 8	34,66	0,26	0,76				

No teste de reprodutibilidade no **ELiTe InGenius**, o ensaio detetou o alvo HSV2 como esperado e mostrou valores de Ct com %CV abaixo de 5% para HSV2 e para o Controlo Interno.

A Capacidade de reprodução inter-instrumento no **ELiTe BeGenius** foi obtida através da análise de amostras do painel em oito réplicas, em uma execução por dia, em dois dias, 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).

A Capacidade de reprodução inter-lote 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. 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 repetição inter-instrumento ELiTe BeGenius								
Amostra	HSV2				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	28,32	0,41	1,46
3 x LoD	8 / 8	37,43	0,42	1,15				
10 x LoD	8 / 8	35,88	0,25	0,75				

Capacidade de repetição inter-lote ELiTe BeGenius								
Amostra	HSV2				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	27,86	0,66	2,37
3 x LoD	8 / 8	36,90	0,58	1,59				
10 x LoD	8 / 8	35,17	0,49	1,39				

No teste de reprodutibilidade no **ELiTe BeGenius**, o ensaio detetou o alvo HSV2 como esperado e mostrou valores de Ct com %CV abaixo de 5% para HSV2 e para o Controlo Interno.

Sensibilidade analítica: capacidade de reprodução com material de referência certificado

A sensibilidade analítica do ensaio, como a capacidade de reprodução do valor de um material de referência calibrado, foi avaliada utilizando como material de referência o painel calibrado «Painel de plasma de HSV2 AcroMetrix» (Life Technologies, US). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação do resultado, com o **ELITe InGenius** e produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o ELITe InGenius				
Amostra	Título nominal cópias/mL	Título nominal cópias/mL Registro ₁₀	Positivo/réplicas	Resultados médios Log ₁₀ cópias / mL
ADN de HSV2 1E6	10 ⁶	6,000	2/2	6,035
ADN de HSV2 1E5	10 ⁵	5,000	2/2	5,067
ADN de HSV2 1E4	10 ⁴	4,000	2/2	3,978
ADN de HSV2 1E3	10 ³	3,000	2/2	3,190
ADN de HSV2 1E2	10 ²	2,000	2/2	1,711

Todas as amostras foram detetadas como positivas com um título que se encontrava dentro do valor esperado de Registro $\pm 0,5$.

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência o Painel EQA ADN do vírus da herpes simplesr QCMD 2014 (Qnostics Ltd, Reino Unido), um painel de diluições de HSV2. Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação do resultado, com o **ELITe InGenius** e produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o ELITe InGenius		
Amostra	Estado da amostra	Positivo/réplicas
HSV DNA14-01	Positivo para HSV1, negativo para HSV2	0/2
HSV DNA14-02	Negativo para HSV1 e HSV2	0/2
HSV DNA14-03	Positivo para HSV1, negativo para HSV2	0/2
HSV DNA14-04	Positivo para HSV1, negativo para HSV2	0/2
HSV DNA14-05	Positivo para HSV1, negativo para HSV2	0/2
HSV DNA14-06	HSV2 Frequentemente detetado	2/2
HSV DNA14-07	HSV2 Detetado	2/2
HSV DNA14-08	HSV2 Frequentemente detetado	2/2
HSV DNA14-09	Positivo para HSV1, negativo para HSV2	0/2
HSV DNA14-10	Negativo para HSV1 e HSV2	0/2

Todas as amostras foram detetadas corretamente.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada através da análise de algumas amostras clínicas de sangue total colhido em EDTA e plasma colhido em EDTA positivas e líquido cefalorraquidiano positivas para ADN de HSV2 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**.

Foi avaliada a sensibilidade diagnóstica usando 23 amostras de sangue total colhido em EDTA negativo para ADN de HSV2, que foram reforçadas para ADN de HSV2 adicionando HSV2MQP01-amostra de meio, de "HSV2 Molecular Q Panel" (Qnostics Ltd, Reino Unido) a um título de 750 cópias/mL; 30 amostras de plasma colhidas em EDTA negativas para ADN de HSV2 que foram reforçadas com ADN de HSV2 adicionando "HSV2 ELITe-IQC High" (ELITech Group S.p.A.) a um título de 750 cópias / mL e 20 amostras de LCR negativo para ADN de HSV2 que foram reforçadas com ADN de HSV2 adicionando "HSV2 ELITe-IQC High" (ELITech Group S.p.A.) num título de 750 cópias/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 estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA e positivo para ADN de HSV2	23	22	1
Plasma colhido em EDTA reforçado com ADN de HSV2	30	30	0
Líquido cefalorraquidiano reforçado com ADN de HSV2	20	20	0

Todas as amostras de plasma e líquido cefalorraquidiano foram válidas e positivas. Todas as amostras de sangue total foram válidas; 22 amostras foram confirmadas como positivas. Uma amostra testou discrepante negativa possivelmente devido a inibição. A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 99%.

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi avaliada através da análise de algumas amostras clínicas de sangue total colhido em EDTA e plasma colhido em EDTA positivas e líquido cefalorraquidiano negativas para ADN de HSV2 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 especificidade do diagnóstico do ensaio obtido em associação com o **ELITe InGenius** também se aplica ao **ELITe BeGenius**.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 34 amostras de sangue total colhido em EDTA a partir de doadores saudáveis que estavam presumivelmente negativos para ADN de HSV2 e 39 amostras de plasma colhido em EDTA a partir de doadores saudáveis que estavam presumivelmente negativos para ADN de HSV2 e 22 amostras de LCR de doadores saudáveis que eram presumivelmente negativos para ADN de HSV2. 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.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA e negativo para ADN de HSV2	34	0	34
Plasma colhido em EDTA e negativo para ADN de HSV2	39	0	39
Líquido cefalorraquidiano e negativo para ADN de HSV2	22	0	22

Todas as amostras de sangue total e líquido cefalorraquidiano foram válidas e negativas. O valor-limite da Ct do controlo interno (Ct CI) está definido para 35. A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 100%.

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

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser usado com **ADN extraído** das seguintes amostras biológicas: líquido cefalorraquidiano (LCR) e sangue total colhido em EDTA, plasma colhido em EDTA.

Líquido cefalorraquidiano (LCR)

As amostras de LCR 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.

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 líquido cefalorraquidiano com o **ELITe STAR** e com **software versão 3.4.13** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **UUNI_E100S200_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 líquido cefalorraquidiano com o **ELITe GALAXY** com **software versão 1.3.1** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **xNA Extraction (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 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 controlo interno antes de adicionar a **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** e prossiga com a extração. Elua os ácidos nucleicos em **100 µL** de tampão de eluição.

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 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 sangue total com o **ELITe STAR** e com **software versão 3.4.13** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **UUNI_E100S200_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 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 através do kit **«EXTRAblood»**, siga o manual de instruções de funcionamento: comece com **200 µL** da amostra (máximo de 2 milhões de leucócitos), elua o ADN em **100 µL** de tampão de eluição.

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_E100S200_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 a partir de plasma 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 controlo interno antes de adicionar a **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** e prossiga com a extração. Elua os ácidos nucleicos em **100 µL** de tampão de eluição.

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/amostra de CPE** à solução para cada amostra necessária. Carregue no instrumento, na ranhura do "controlo 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 indicações no manual de instruções de utilização do kit.

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 imunossuppressores.

reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS032PLD

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.

Figure 1 shows a 12x12 grid of circles. The top row of circles is labeled S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, and S12 from left to right. The first column of circles is labeled CN, 10₂, 10₃, 10₄, 10₅, and then empty circles for the remaining rows. The grid represents a 2D lattice of particles.

reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS032PLD

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

- 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 detecção (45 ciclos)	94 °C	10 seg.
	60 °C (recolha de dados)	30 seg.
	72 °C	20 seg.
Dissociação (opcional)	95 °C	15 seg.
	40 °C	1 min.
	80 °C	15 seg.
Dissociação (opcional)	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 importante fazer o seguinte:

- descongelar os tubos que contêm as amostras a serem analisadas. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo;
- descongele os tubos da **HSV2 Q - PCR Mix** 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 o **HSV2 - Positive Control** ou os tubos **HSV2 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 **HSV2 Q - PCR Mix** no fundo dos poços 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 base no resultado necessário (qualitativo ou quantitativo), deve seguir uma das destas duas opções:

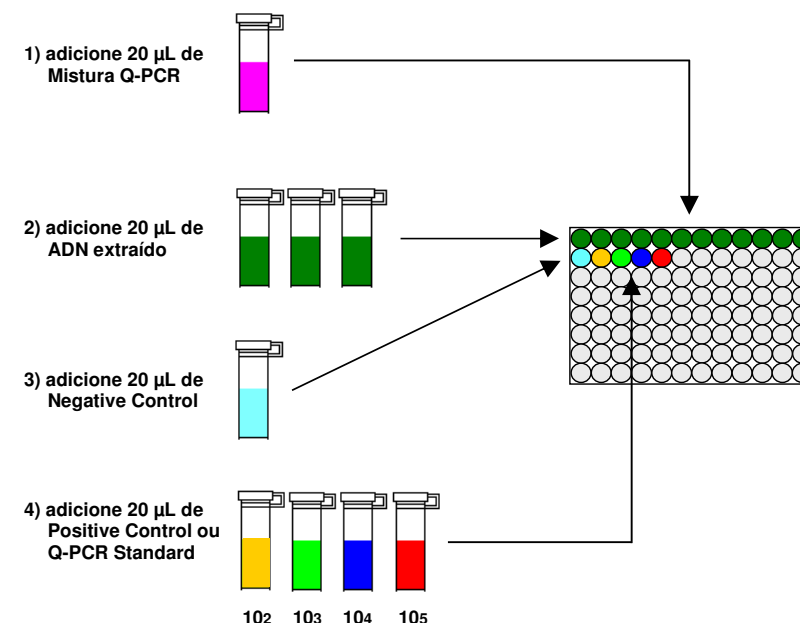
- Quando for necessário um resultado **qualitativo** (detecção de ADN de HSV2): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **HSV2 - Positive Control** no poço correspondente na **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o controlo positivo introduzindo com a pipeta o **HSV2 - Positive Control** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.

- Quando for necessário um resultado **quantitativo** (quantificação de ADN de HSV2): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **HSV2 Q - PCR Standard 102** no poço correspondente na **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o padrão introduzindo com a pipeta o **HSV2 Q - PCR Standard 102** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma com os outros **HSV2 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., "ano-mês-dia-HSV2-EGSpA").

Nota: No final do ciclo térmico a **Amplification microplate** 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 reação completa 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 HSV2 (detetor FAM "HSV2") 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 HSV2, a fluorescência FAM da sonda específica do HSV2 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 "HSV2" 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 "HSV2" 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 do **Limiar** de fluorescência permitem determinar o **Ciclo do limiar (Ct)**, o ciclo em que a fluorescência alcançou o valor do **Limiar**.

Na reação de amplificação **Positive Control***, o valor de **Ct** do HSV2 (Resultados > Relatório) é usado para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Detetor de reação de controlo positivo FAM "HSV2"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação de **Positive control** for **Ct > 25** ou **Ct não determinado** para HSV2, 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 do controlo positivo, degradação da mistura de reação ou do controlo positivo, definição incorreta da posição do controlo positivo, 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.

***Nota:** Quando este produto for usado para a quantificação de ADN de HSV2, foram preparadas as reações de **Q - PCR Standard** em vez da reação de **Positive Control**. Neste caso, valide a amplificação e a deteção através da referência à reação de amplificação de **Q - PCR Standard 10s (Ct ≤ 25)**.

Na reação de amplificação do **Negative Control**, o valor da **Ct** do HSV2 (Resultados > Relatório) é usado para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Negative Control reaction detector FAM "HSV2"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct não determinado	NEGATIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação do **Negative control** for diferente de **Ct não determinada** para HSV2, o ADN alvo não 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 HSV2 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 cópias de ADN do gene gpG de HSV2 na reação de amplificação, que corresponde aos 10 Equivalentes do genoma por reação (limite de deteção, consulte o parágrafo 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	HSV2 DNA
detetor FAM "HSV2"	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 HSV2 e **Ct > 35** ou **Ct não determinado** para o Controlo interno, significa que é 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 (perda de ADN durante a extração ou presença de inibidores) 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 HSV2 e **Ct ≤ 35** para o Controlo Interno, significa que o ADN do HSV2 não é detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode excluir-se o facto de o ADN do HSV2 ter um título mais baixo que o limite de deteção do produto (consulte 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 HSV2 é detetado na reação de amplificação de uma amostra, o Internal Control pode resultar em **Ct > 35** ou **Ct não determinado**. Na realidade, a reação de amplificação de baixa eficiência para o Internal Control pode ser deslocada por concorrência com a reação de amplificação de elevada eficiência para o ADN do HSV2. 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.

Nas reações de amplificação dos quatro **Q - PCR standards**, os valores de **Ct** do HSV2 são usados para calcular a **Curva Standard** (Resultados > Curva Standard) para a sessão de amplificação e para validar a amplificação e a detecção como descrito na tabela seguinte:

Standard Curve detector FAM "HSV2"	Intervalo de aceitação	Amplificação/detecção
Coefficiente de correlação (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRETO

Se o valor do **Coefficiente de correlação (R2)** não se encontrar dentro dos limites, isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação ou detecção (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 pode causar resultados incorretos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

Os valores de **Ct** do HSV2 na reação de amplificação de cada **amostra** e a **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 1.000.000 a 10 cópias de ADN do gene gpG de HSV2 na reação de amplificação, que corresponde aos Equivalentes do genoma por reação (intervalo de medição linear, consulte Características de desempenho), tal como descrito na tabela seguinte:

Sample result detector FAM "HSV2"	Equivalentes do genoma HSV2 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 **amostras** (Resultados > Relatório) são usados para calcular os equivalentes do genoma (**cp**) do HSV2 presente na amostra usada na extração (**Nc**) de acordo com esta fórmula:

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

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 cp por reação**.

Quando é usado «**ELITe STAR**» com amostras de sangue total, plasma colhido em EDTA ou amostras de líquido cefalorraquidiano colhido em EDTA e é necessário o resultado **expresso em cp/mL**, a fórmula passa a ser:

$$Nc (cp/mL) = 28 \times Quantidade$$

Quando é usado «**ELITe GALAXY**» com amostras de sangue total, plasma colhido em EDTA ou amostras de líquido cefalorraquidiano colhido em EDTA e é necessário o resultado **expresso em cp/mL**, a fórmula passa a ser:

$$Nc (cp/mL) = 35 \times Quantidade$$

Quando é usado o kit de extração «**EXTRAblood**» com amostras de sangue total colhido em EDTA e é necessário o resultado **expresso em cp/mL**, a fórmula passa a ser:

$$Nc (cp/mL) = 25 \times Quantidade$$

Quando é usado o sistema de extração «**NucliSENS® easyMAG®**» com plasma colhido em EDTA e amostras de líquido cefalorraquidiano e é necessário o resultado **expresso em cp/mL**, a fórmula passa a ser:

$$Nc (cp/mL) = 10 \times Quantidade$$

Quando é usado o kit de extração «**QIAasymphony® SP/AS**» com amostras de plasma colhido em EDTA e é necessário o resultado **expresso em cp/mL**, a fórmula passa a ser:

$$Nc (cp/mL) = 12 \times Quantidade$$

Cálculo dos limites do intervalo de medição linear

Os limites do intervalo de medição linear como cp/mL amostra, quando é usado um método de extração particular, podem ser calculados a partir do intervalo de medição linear da reação de amplificação de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Limite inferior (cp/mL)} = \frac{Ve \times 10 \text{ cp}}{Vc \times Va \times Ep}$$

$$\text{Limite superior (cp/mL)} = \frac{Ve \times 1.000.000 \text{ cp}}{Vc \times Va \times Ep}$$

Quando é usado o kit de extração «**EXTRAblood**» com amostras de sangue total colhido em EDTA, a fórmula passa a ser:

$$\text{Limite inferior (cp/mL)} = 25 \times 10 \text{ cp}$$

$$\text{Limite superior (cp/mL)} = 25 \times 1.000.000 \text{ cp}$$

de 250 a 25.000.000 cp/mL

Quando é usado o sistema de extração «**ELITe STAR**» com amostras de sangue total, plasma colhido em EDTA ou amostras de líquido cefalorraquidiano, a fórmula passa a ser:

$$\text{Limite inferior (cp/mL)} = 28 \times 10 \text{ cp}$$

$$\text{Limite superior (cp/mL)} = 28 \times 1.000.000 \text{ cp}$$

de 280 a 28.000.000 cp/mL

Quando é usado o sistema de extração «**ELITe GALAXY**» com amostras de sangue total, plasma colhido em EDTA ou amostras de líquido cefalorraquidiano, a fórmula passa a ser:

Limites do intervalo de medição (cp/mL) com «ELITe GALAXY»
Limite inferior (cp/mL) = 35 x 10 cp
Limite superior (cp/mL) = 35 x 1.000.000 cp
de 350 a 35.000.000 cp/mL

Quando é usado o kit de extração «**NucliSENS® easyMAG®**» com amostras de plasma colhido em EDTA ou amostras de líquido cefalorraquidiano, a fórmula passa a ser:

Limites do intervalo de medição (cp/mL) com «NucliSENS® easyMAG®»
Limite inferior (cp/mL) = 10 x 10 cp
Limite superior (cp/mL) = 10 x 1.000.000 cp
de 100 a 10.000.000 cp/mL

Quando é usado o kit de extração «**QIAasymphony® SP/AS**» com amostras de plasma colhido em EDTA, a fórmula passa a ser:

Limites do intervalo de medição (cp/mL) com «QIAasymphony® SP/AS»
Limite inferior (cp/mL) = 12 x 10 cp
Limite superior (cp/mL) = 12 x 1.000.000 cp
de 120 a 12.000.000 cp/mL

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade analítica: limite de deteção

A sensibilidade analítica deste ensaio permite a deteção da presença de cerca de 10 moléculas de ADN alvo 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 usada em 50 réplicas a realizarem a amplificação por produtos ELITechGroup S.p.A..

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte:

Amostras	Não.	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 «**ELITe GALAXY**» foi verificada com um painel de diluições de HSV2 dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da amostra HSV08-12 do "QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel" (Qnostics, Ltd, RU) em ADN de HSV2 - sangue total EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 10 cp/mL a 560 cp/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%.

A sensibilidade analítica como cp/mL está reportada a seguir

Limite de deteção para amostras de sangue total e ELITe GALAXY (cp/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	171 cp / mL	112 cp / mL	505 cp / mL

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de plasma e o «**ELITe GALAXY**» foi verificada com um painel de diluições de HSV2 dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da amostra HSV08-12 do "QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel" (Qnostics, Ltd, RU) em ADN de HSV2 - plasma EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 10 cp/mL a 560 cp/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%.

A sensibilidade analítica como cp/mL está reportada a seguir

Limite de deteção para amostras de plasma e ELITe GALAXY (cp/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	119 cp / mL	75 cp / mL	547 cp / mL

Sensibilidade analítica: intervalo de medição linear

A sensibilidade analítica deste ensaio permite a quantificação desde 1.000.000 a 10 moléculas de ADN alvo nos 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A sensibilidade analítica deste ensaio, enquanto intervalo de medição linear, foi determinada com recurso a um painel de diluições (1 registo10 entre uma diluição e a seguinte) de ADN plasmídico contendo o produto de amplificação, cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. As diluições de 107 moléculas por reação a 101 moléculas 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 todos os pontos do painel (coeficiente de correlação linear superior a 0,99).

O limite superior do intervalo de medição linear foi definido a 10⁶ moléculas por reação, o que corresponde ao equivalente de genoma por reação, dentro de um algoritmo desde a concentração mais alta do standard de amplificação Q - PCR Standard (10⁵ moléculas/20 µL).

O limite inferior do intervalo de medição linear foi definido a 10 moléculas por reação, o que corresponde ao equivalente de genoma por reação, dentro de um algoritmo desde a concentração mais baixa do standard de amplificação Q - PCR Standard (10² moléculas/20 µL).

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte:

Intervalo de medição linear (cp/reação)	
Limite superior	1.000.000 cp/reação
Limite inferior	10 cp/reação

Os limites do intervalo de medição linear como cp/mL referentes ao kit de extração usado são calculados na página 26.

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 cerca de 18,6% das quantidades medidas, dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10 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 14,4% das quantidades medidas, dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10 moléculas nos 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

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

Sensibilidade analítica: capacidade de reprodução com material de referência calibrado

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 testando um painel de proficiência.

Foram realizados testes utilizando como material de referência calibrado um painel de diluições de HSV2 dentro do limite de concentração (QCMD 2009 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, RU). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração com «**ELITe STAR**» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte:

Testes com materiais de referência calibrados e o «ELITe STAR»				
Amostra	Vírus	Consenso do ensaio comercial Log ₁₀ Conc. do vírus	Desvio padrão	Resultados médios Cp/mL de Registo ₁₀
HSV09-01	HSV1	2,215	0,789	-
HSV09-02	HSV2	2,236	0,938	1,687
HSV09-03	HSV2	3,293	0,915	3,700
HSV09-04	HSV2	2,314	0,898	2,329
HSV09-05	Negativo	N/A	-	-
HSV09-06	HSV1	2,402	0,665	-
HSV09-07	HSV1	4,189	0,599	-
HSV09-08	HSV2	2,389	0,827	2,352
HSV09-09	Negativo	N/A	-	-
HSV09-10	HSV1	3,205	0,767	-

Todas as amostras foram detetadas corretamente. Os resultados quantitativos estão dentro do intervalo definido pelo Desvio padrão ± 1 do consenso.

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência calibrado um painel de diluições de HSV2 dentro do limite de concentração (QCMD 2012 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, RU). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração com «**ELITe GALAXY**» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte em cp/mL.

Testes com materiais de referência calibrados e o «ELITe GALAXY»				
Amostra	Consenso do ensaio comercial Log ₁₀ Conc. do vírus	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios Cp/mL de Registo ₁₀
HSV12-01	Negativo, NA	-	0/2	-
HSV12-02	HSV1, 3,910	0,582	0/2	-
HSV12-03	HSV2, 1,948	0,305	1/2	2,128
HSV12-04	HSV1, 3,680	0,547	0/2	-
HSV12-05	HSV2, 1,352	0,629	0/2	-
HSV12-06	HSV1, 2,318	0,441	0/2	-
HSV12-07	HSV1, 2,014	0,296	0/2	-
HSV12-08	HSV2, 3,424	1,098	2/2	3,634
HSV12-09	Negativo, NA	-	0/2	-
HSV12-10	HSV2, 3,417	1,042	2/2	3,861

Todas as amostras negativas foram relatadas corretamente. As amostras positivas dentro do limite de deteção teórico do sistema (350 cópias/mL) foram corretamente detetadas dentro do intervalo do valor de "Consenso" médio do ensaio comercial ± 1 de desvio padrão. Uma amostra abaixo do limite de deteção teórico do sistema (22,5 cópias/mL) foi relatada como negativa. As amostras com título abaixo do limite de deteção podem ser estocasticamente relatadas como positivas ou negativas.

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

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como eficiência de deteção 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 gene gpC do HSV2 revelou a respetiva conservação e ausência de mutações significativas.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi testada com recurso a algumas amostras clínicas de sangue total colhidas em EDTA, com teste positivo para ADN de HSV2.

A sensibilidade do diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 20 amostras de sangue total colhido em EDTA de doadores presumivelmente negativas (Biological Sample Library Europe S.A.S., Lion, France), testadas positivas num título baixo para ADN de HSV2 com QCMD 2008 Herpes simplex virus EQA Panel (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada amostra de sangue total foi usada para realizar toda a análise, extração 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 e positivo para ADN de HSV2	20	20	0

Todas as amostras reforçadas foram corretamente detetadas como positivas para ADN de HSV2.

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

A sensibilidade diagnóstica foi avaliada usando 22 amostras de líquido cefalorraquidiano negativo para ADN de HSV2, que foram reforçadas para ADN de HSV2 adicionando uma amostra de IQC032RH, do ELITechGroup S.p.A., 30 amostras de plasma negativo para ADN de HSV2 que foram reforçadas com ADN de HSV2 adicionando amostra de HSV08-12, do QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel (Qnostics Ltd, Reino Unido) e 30 amostras de sangue total para ADN de HSV2, que foram reforçadas para ADN de HSV2 adicionando HSV08-12, de QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada amostra foi usada para realização de todo o procedimento de análise: extração com «**ELITe STAR**» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Líquido cefalorraquidiano reforçado para ADN de HSV2	22	22	0
Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de HSV2	30	30	0
Sangue total colhido em EDTA reforçado para ADN de HSV2	30	29	0

Uma amostra positiva para HSV2 resultou ser inválida.

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

A sensibilidade diagnóstica foi avaliada usando 21 amostras de líquido cefalorraquidiano negativas para ADN de HSV2, que foram reforçadas para ADN de HSV2 adicionando HSV2MQP01 - alta amostra, do Molecular Q Panel (Qnostics Ltd, RU), 30 amostras de plasma negativo para ADN de HSV2, que foram reforçadas para ADN de HSV2 adicionando amostra de HSV08-12, do QCMD 2008 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel, (Qnostics Ltd, RU) e 32 amostras de sangue total negativas para ADN de HSV2, que foram reforçadas para ADN de HSV2 adicionando a amostra de HSV08-12, do QCMD 2008 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel, (Qnostics Ltd, RU) e amostra de HSV10-01, do QCMD 2010 Herpes Simplex Human virus DNA EQA Panel, (Qnostics Ltd, RU). Cada amostra foi usada para realização de todo o procedimento de análise: extração com «**ELITe GALAXY**» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Líquido cefalorraquidiano reforçado para ADN de HSV2	21	21	0
Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de HSV2	30	30	0
Sangue total colhido em EDTA reforçado para ADN de HSV2	32	32	0

Todas as amostras reforçadas foram corretamente detetadas como positivas para ADN de HSV2.

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

Especificidade analítica: ausência de marcadores potencialmente interferentes de reatividade cruzada

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 HSV2, incluindo genomas completos de HSV1 e VZV, o vírus herpético humano que é o mais semelhante ao HSV2, 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 num painel de proficiência.

A especificidade analítica foi avaliada utilizando como material de referência calibrado e certificado um painel que inclui amostras positivas de HSV1 e positivas de VZV (QCMD 2007 Herpes simplex virus EQA Panel, Qnostics Ltd, RU). Cada amostra foi testada em duplicado através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados no parágrafo "Sensibilidade analítica: capacidade de reprodução com material de referência calibrado".

Não foi detetada qualquer reatividade cruzada com amostras positivas para HSV1 e VZV.

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi testada com recurso a algumas amostras clínicas negativas de ADB de HSV2 de sangue total colhidas em EDTA, com testes negativos para ADN de HSV2

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 24 amostras de sangue total colhido em EDTA presumivelmente negativas para ADN de ADV HSV2 (Biological Sample Library Europe S.A.S., Lion, França). Cada amostra de sangue total foi usada para realizar toda a análise, extração 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 e negativo para ADN de HSV2	24	0	24

Todas as amostras foram detetadas como negativas para ADN de HSV2.

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

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 24 amostras de líquido cefalorraquidiano negativas para ADN de HSV2, 30 amostras de plasma colhido em EDTA negativas para ADN de HSV2 e 30 amostras de sangue total colhido em EDTA negativas para ADN de HSV2 (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi usada para realização de todo o procedimento de análise: extração com «**ELITe STAR**» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Líquido cefalorraquidiano negativo para ADN de HSV2	24	0	24
Plasma colhido em EDTA negativo para ADN de HSV2	30	0	30
Sangue total colhido em EDTA e negativo para ADN de HSV2	30	0	30

Todas as amostras foram detetadas como negativas para ADN de HSV2.

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

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 22 amostras de líquido cefalorraquidiano negativas para ADN de HSV2, 34 amostras de plasma colhido em EDTA presumivelmente negativas para ADN de HSV2 e 36 amostras de sangue total colhido em EDTA presumivelmente negativas para ADN de HSV2. Cada amostra foi usada para realização de todo o procedimento de análise: extração com «**ELITe GALAXY**» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Líquido cefalorraquidiano negativo para ADN de HSV2	22	0	22
Plasma colhido em EDTA e presumivelmente negativo para ADN de HSV2	34	0	34
Sangue total colhido em EDTA presumivelmente negativo para ADN de HSV2	36	0	36

Todas as amostras foram corretamente detetadas como negativas para ADN de HSV2.

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

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 "HSV2 ELITe MGB Kit", FTP RTS032PLD.

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 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.

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 imunossuppressores.

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 «**HSV2 - ELITe Positive Control**» ou, em alternativa, o produto «**HSV2 - ELITe Positive Control RF**» ou o produto «**HSV2 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/detecção de produtos de amplificação)

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");
- 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 HSV2 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 cópias, 10⁴ cópias, 10³ cópias, 10² cópias) 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
CN	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵							

Legenda: C1 - C12: Amostras a serem analisadas; NC: Controlo de amplificação negativo; 10²: 10² cópias standard; 10³: 10³ cópias standard; 10⁴: 10⁴ cópias standard; 10⁵: 10⁵ cópias 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 centrifugadora 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 **HSV2 Q - PCR Mix** 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 centrifugadora 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 **HSV2 - ELITe Positive Control** ou, em alternativa, o **HSV2 - ELITe Positive Control RF** ou os tubos de teste contendo **HSV2 Q - PCR Standard**. Agite suavemente os tubos e depois coloque-os na centrifugadora 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 **HSV2 Q - PCR Mix** para os furos na **AD-plate** 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** (detecção de ADN de HSV2): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** of **HSV2 - Positive Control** ou, em alternativa «**HSV2 - ELITe Positive Control RF**» no furo correspondente da **Amplification microplate**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o controlo positivo introduzindo com a pipeta o **HSV2 - Positive Control** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.

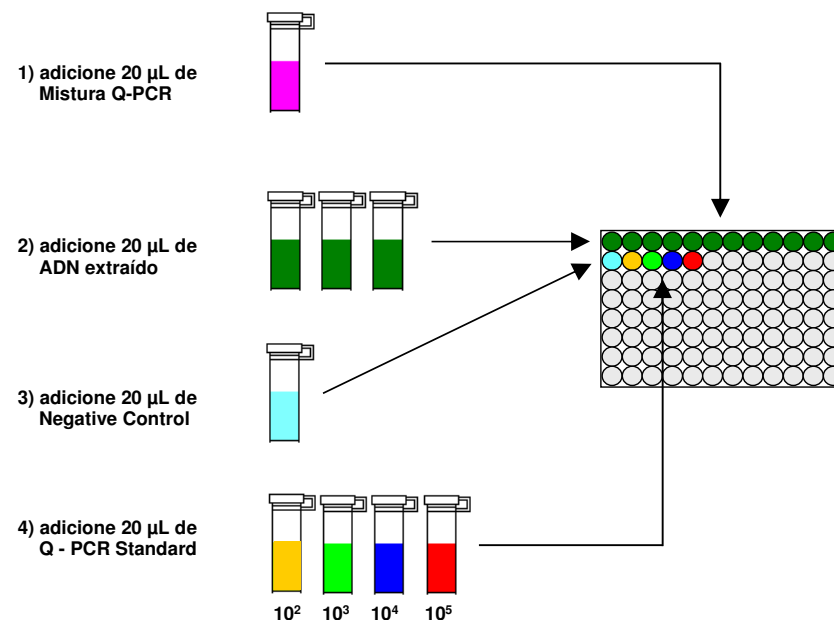
- Quando for necessário um resultado **quantitativo** (quantificação de ADN de HSV2): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **HSV2 Q - PCR Standard 102** no poço correspondente na **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o padrão introduzindo com a pipeta o **HSV2 Q - PCR Standard 102** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma com os outros **HSV2 Q - PCR Standards (103, 104, 105)**.

5. Vede cuidadosamente a **Placa AD** utilizando a **Película vedante**.

6. Transfira a **AD-plate** para o ciclo térmico de amplificação/detecção 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-HSV2-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.

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



Análise dos resultados qualitativos

Os valores de fluorescência emitidos pelo detetor de HSV2 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**

- defina manualmente o **Limiar** e **Banda de ruído** para o detetor FAM "HSV2" 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 "HSV2" 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 HSV2 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 detecção como mostrado na tabela seguinte:

Reaction Q - PCR Standard 10 ⁵ "HSV2" detector	Resultado do ensaio	Amplificação/detecção
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação **Positive Control** para a **Ct > 25** ou **Ct indeterminada** para HSV2, o ADN do alvo não foi corretamente detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação ou detecção (distribuição incorreta da mistura de reação ou do controlo positivo, degradação da mistura de reação ou do controlo positivo, definição incorreta da posição do controlo positivo, 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.

* **Nota:** Quando este produto for usado para a quantificação de ADN de HSV2, foram preparadas as reações de **Q - PCR Standard** em vez da reação de **Positive Control**. Neste caso, valide a amplificação e a detecção através da referência à reação de amplificação de **Q - PCR Standard 10⁵ (Ct ≤ 25)**.

Durante a reação de amplificação do **Negative Control**, o valor de **Ct** do HSV2 (Janela de análise) é usado para validar a amplificação e a detecção como descrito na tabela seguinte:

Negative Control Reaction "HSV2" detector	Resultado do ensaio	Amplificação/detecção
Ct não determinado	NEGATIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação do **Negative Control** for diferente de **Ct indeterminada** para HSV2, foi detetada a presença do ADN do 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 HSV2 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 detecção.

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	HSV2 DNA
Detetor "HSV2"	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 HSV2 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 HSV2 e **Ct ≤ 35** para o Controlo Interno, o ADN do HSV2 não foi detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode excluir-se o facto de o ADN do HSV2 estar presente a uma concentração inferior ao limite de detecção 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 HSV2 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 HSV2 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 detecção (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 HSV2 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 cópias por reação, desde 25.000.000 a 250 cópias por mL de sangue total e plasma utilizando o sistema de extração **MagNA Pure 24** (ver Características de desempenho), como mostrados na tabela seguinte:

Sample result FAM "HSV2" detector	Cópias HSV2 por reação
Quantidade > 1 x 10⁶	MAIS DE 1.000.000
1,0 x 10⁵ ≤ Quantidade ≤ 1 x 10⁶	= Quantidade
Quantidade < 1,0 x 10⁵	MENOS DE 10

Os resultados (**Quantidade**) relacionados com cada **amostra** (Janela de análise) são usados para calcular as **cópias** de HSV2 presentes na amostra de origem (**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 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 cópias por reação**.

Quando utilizar amostras de sangue total colhidas em EDTA e plasma colhido em EDTA e o sistema de extração **MagNA Pure 24** e o resultado tiver de ser **expresso em cópias/mL**, a fórmula passa a ser:

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

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	27	0

Sensibilidade analítica: intervalo de medição linear

A sensibilidade analítica deste ensaio, como intervalo de medição linear, permite a quantificação desde cerca de 25.000.000 até cerca de 25 cópias 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 registro 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 cópias/reação dentro de 1 algoritmo desde a concentração mais baixa do standard de amplificação Q - PCR Standard (10² cópias/20 µL).

O limite superior do intervalo de medição linear foi definido a 10⁶ cópias/reação, dentro de um algoritmo desde a concentração mais alta do standard de amplificação Q - PCR Standard (10⁵ cópias/20 µL).

Os resultados estão mostrados na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear utilizando o MagNA Pure 24		
	Limite inferior	Limite superior
cópias/mL	250	25.000.000
cópias/reação	10	1.000.000

As conversões de cópias/mL para cópias/reação e vice-versa foram calculadas como mostrado na página 39.

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 média do Coeficiente de variação (% CV) dos valores de Ct inferior a 1%, dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ 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 9% dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ 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 logarítmica medida de cerca de 6,4% dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ 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.

Sensibilidade analítica: capacidade de reprodução com material de referência certificado

A sensibilidade analítica do ensaio, como a capacidade de reprodução do valor de um material de referência calibrado, foi avaliada utilizando como material de referência o «Painel "Q" molecular de HSV2 (Qnostics Ltd, RU). Cada amostra do painel foi testada em 2 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.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o «MagNA Pure 24»	
Amostra	Positivos/réplicas
HSV2MQP01-Alto	2/2
HSV2MQP01-Médio	2/2
HSV2MQP01-Baixo	2/2
HSV2MQP01-Negativo	0/2

Todas as amostras foram detetadas corretamente.

A sensibilidade analítica do ensaio, como a capacidade de reprodução do valor de um material de referência calibrado, foi avaliada utilizando como material de referência um painel de diluições de HSV2 QCMD 2017 Herpes Simplex Virus DNA Panel (HSVDNA17S, Qnostics Ltd, RU). Cada amostra do painel foi testada em 2 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.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o «MagNA Pure 24»		
Amostra	Estado da amostra	Positivo/réplicas
HSVDNA17S-01	Positivo para HSV1, negativo para HSV2	0/2
HSVDNA17S -02	Positivo para HSV1, negativo para HSV2	0/2
HSVDNA17S -03	Positivo para HSV1, negativo para HSV2	0/2
HSVDNA17S -04	Positivo para HSV1, negativo para HSV2	0/2
HSVDNA17S -05	Positivo para HSV1, negativo para HSV2	0/2
HSVDNA17S -06	HSV2 Frequentemente detetado	2/2
HSVDNA17S -07	HSV2 Frequentemente detetado	2/2
HSVDNA17S -08	HSV2 Frequentemente detetado	2/2
HSVDNA17S -09	HSV2 Detetado	2/2
HSVDNA17S -10	HSV2 Frequentemente detetado	2/2

Todas as amostras foram detetadas corretamente.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 30 amostras de sangue total colhido em EDTA negativas para ADN de HSV2, que foram reforçadas para ADN de HSV2 adicionando HSV2MQP01-High sample (Qnostics Ltd, RU), e 30 amostras de plasma colhidas em EDTA, negativas para ADN de HSV2, que foram reforçadas com ADN de HSV2 adicionando HSV2MQP01-High sample (Qnostics Ltd, RU).

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 reforçado para ADN de HSV2	30	30	0
Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de HSV2	30	30	0

Todas as amostras foram válidas no primeiro teste e confirmadas positivas para ADN de HSV2.

A sensibilidade de diagnóstico total do ensaio foi de 100%.

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 40 amostras de sangue total colhido em EDTA presumivelmente negativas para ADN de HSV2 e 34 amostras de plasma colhido em EDTA presumivelmente negativas para ADN de HSV2.

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 HSV2	40	0	40
Plasma colhido em EDTA e presumivelmente negativo para ADN de HSV2	34	0	34

Todas as amostras foram válidas no primeiro teste e confirmadas negativas para ADN de HSV2.

A especificidade de diagnóstico total do ensaio foi de 100%.

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 "HSV2 ELITe MGB Kit", FTP RTS032PLD.

REFERÊNCIAS

- E. Aurelius et al. (1993) *J. Med. Virology* **39**: 179 - 186
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**: e30

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Utilize este produto apenas com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: líquido cefalorraquidiano (LCR), sangue total colhido em EDTA, plasma colhido em EDTA.

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, líquido amniótico.

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 positivas para HSV2, dos controlos positivos e dos mesmos produtos de amplificação. Contaminações cruzadas causadas por falsos resultados positivos. O formato do produto é capaz de limitar contaminações cruzadas. No entanto, as contaminações cruzadas podem ser evitadas simplesmente através de boas práticas laboratoriais e do cumprimento destas instruções de utilização.

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

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

Este produto 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.

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.

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 HSV2 não é detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode ser excluído que o ADN de HSV2 possui 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 de HSV2.

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 reações 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.	Verifique a posição da mistura de reação, controlo positivo ou standards. Verifique os volumes da mistura de reação, controlo positivo ou 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 de controlo positivo ou standard no instrumento. Verifique as definições do ciclo térmico no instrumento.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

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, controlos negativos, controlos positivos e standards para os furos da microplaca e cumpra a ficha de trabalho.
Preparação da sessão incorreta no ELITe InGenius	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, dos controlos negativos, dos controlos positivos 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.	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" (Apenas PCR). 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.

Níveis de fluorescência de fundo irregulares ou elevados nas reações	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta da amostra.	Tenha cuidado, inserindo a pipeta três vezes, quando misturar amostras, controlos negativos, controlos positivos ou standards na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.
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 anómala	
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.

Com o ELITe InGenius: Erro 30103	
Causas possíveis	Soluções
Concentração demasiado alta do alvo na amostra.	Se for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR: - repita a amplificação da amostra eluída em água de qualidade para biologia molecular, numa sessão "Apenas PCR" ou - repita a extração com uma diluição da amostra primária em água de qualidade para biologia molecular, numa sessão "Extração+PCR".

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*.



Contém suficiente para "N" testes.



Atenção, consulte as instruções de utilização.



Conteúdo.



Manter afastado da luz solar.



Fabricante.

NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA

Este produto contém reagentes produzidos pela Life Technologies Corporation e são vendidos ao abrigo de contratos de licenciamento celebrados entre a ELITechGroup S.p.A. e respetivas sucursais e a Life Technologies Corporation. O preço de compra deste produto inclui direitos exclusivos, não transmissíveis, de utilização apenas desta quantidade do produto exclusivamente para atividades do comprador que estejam diretamente relacionadas com diagnósticos em humanos. Para obter mais informações sobre a aquisição de uma licença deste produto para outros fins que não os acima indicados, contacte o Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Telefone: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. E-mail: outlicensing@thermofisher.com.

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

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

ELITe MGB®, o logótipo ELITe MGB® e ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® estão registados como marcas comerciais na União Europeia.

«NucliSENS® easyMAG®» são marcas comerciais registadas da bioMérieux SA.

«QIAAsymphony®» é uma marca comercial registada da QIAGEN GmbH.

Ficol® é uma marca comercial registada da GE Healthcare.

HSV2 ELITE MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS032PLD



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 «**HSV2 ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of type 2 Herpes Simplex human virus (HSV2)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV2 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with the instruments **ELITE InGenius®** and **ELITE BeGenius®**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HSV2	Glicoprotein G (gpG)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

- › **Whole Blood** EDTA, **Plasma** EDTA, **CSF**

D. Kit content

HSV2 Q-PCR Mix



X 4

Ready-to-use PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL
96 reactions per kit
5 freeze-thaw cycles per tube

- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> › ELITE InGenius® instrument: INT030 › ELITE BeGenius® instrument: INT040 › ELITE InGenius SP200 extraction cartridge: INT032SP200 › ELITE InGenius PCR Cassette amplification cartridge: INT035PCR › ELITE InGenius SP200 Consumable Set consumable for extraction: INT032CS | <ul style="list-style-type: none"> › HSV2 - ELITE Standard: STD032PLD › HSV2 - ELITE Positive Control: CTR032PLD › CPE – Internal Control: CTRCPE › ELITE InGenius Waste Box: F2102-000 › 300 µL Filter Tips Axygen: TF-350-L-R-S › 1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118 |
|--|--|

F. Protocol

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> › Sample volume 200 µL › CPE Internal Control volume 10 µL › Total eluate volume 100 µL › PCR eluate input volume 20 µL › Q-PCR Mix volume 20 µL | <ul style="list-style-type: none"> › Unit of quantitative result Copies/mL › Frequency of controls 15 days › Frequency of calibration 60 days |
|--|--|

G. Performance ELITE InGenius® and ELITE BeGenius®

Matrix	Limit of Detection	Linearity Range	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	171 cp / mL	171 – 25,000,000	96% 22/23*	100% 34/34*
Plasma	119 cp /mL	119 – 25,000,000	100% 30/30*	100% 39/39*
CSF	119 cp /mL	119 – 25,000,000	100% 20/20*	100% 22/22*

*confirmed samples/ tested samples

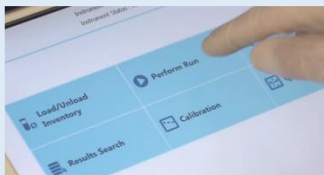
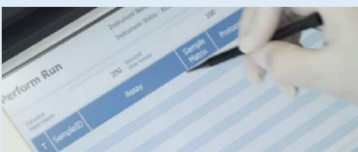
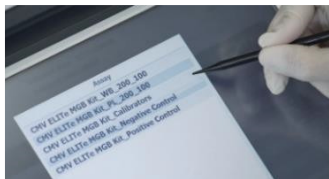
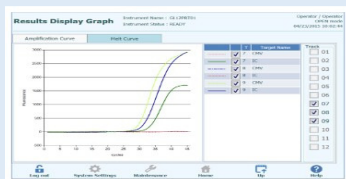
H. Procedures ELITE InGenius®

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: HSV2 Q-PCR Standard in the "Calibration menu" Verify controls: HSV2 positive and negative controls in the "Control menu" <i>N.B:</i> Both have been run, approved and not expired	3. Thaw the Q-PCR-Mix and the 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 volume: Input: "200 µL", eluate: "100 µL" 	3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID 
4. Select the "Assay protocol" of interest 	5. Select the sample position: Primary tube or extraction tube 	6. Load the Q-PCR Mix and the Internal Control in the inventory block 
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, extraction 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 Elution tubes rack
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 Internal Control in the inventory block
7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, extraction tube and primary sample racks	8. Close the door Start the run	9. Archive the eluate sample

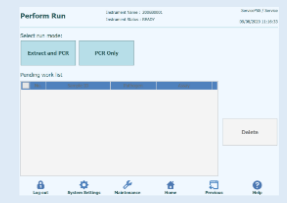
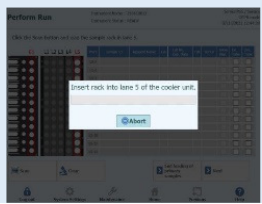
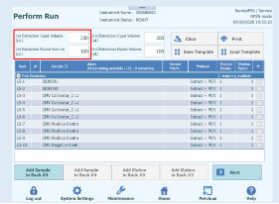
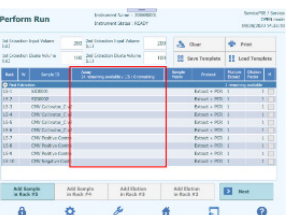
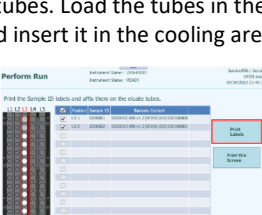
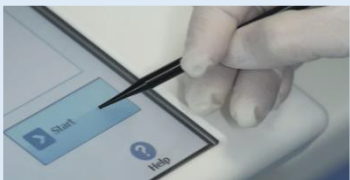
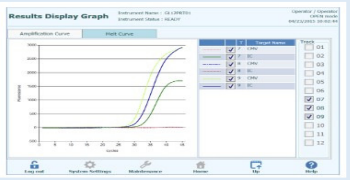
L. Procedures ELITE BeGenius®

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

Before analysis

1. Switch on ELITE BeGenius Identification with username and password Select the mode “Closed”	2. Verify calibrators: HSV2 Q-PCR standard in the “Calibration menu” Verify controls: HSV2 pos. and neg. controls in the “Control menu” <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired	3. Thaw the HSV2 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 and then click on the run mode «Extraction and PCR» 	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 	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 

Note: if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4

Procedure 2 - PCR only

1. Select “Perform Run” on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»	2. Load the extracted nucleic acid barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area	3. Select the “Assay protocol” of interest
4. Load the Q-PCR-Mix in Reagent Rack and insert it in the cooling area Load filter tips and the PCR rack	5. Close the door. Start the run	6. 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” in the Assay Protocol selection screen.	6. Load the CPE Internal Control in the Elution Rack and insert it in the cooling area
7. Load : Filter Tips and the Extraction Rack	8. Close the door Start the run	9. Archive the eluate sample

HSV2 ELiTe MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Ref: RTS032PLD



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 «**HSV2 ELiTe MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of type 2 Herpes Simplex human virus (HSV2)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV2 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. 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 **QIAasymphony** (Qiagen).

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HSV2	Glicoprotein G (gpG)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA

› Plasma EDTA

› Cerebrospinal fluid

D. Kit content

HSV2 Q-PCR Mix



X 4

Ready-to-use PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL
100 reactions per kit
5 freeze-thaw cycles per tube

- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › **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
- ›

- › **HSV2 ELiTe Standard**: STD032PLD
- › **HSV2 - ELiTe Positive Control**: CTR032PLD
- › **CPE - Internal Control**: CTCRPE
- › **easyMAG** - Generic protocol 2.0.1
- › **QIAasymphony** - 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	10 gEq/reaction	100% (30/30)*	100% (30/30)*
	Plasma	10 gEq/reaction	100% (30/30)*	100% (30/30)
	CSF	10 gEq/reaction	100% (22/22)*	100% (24/24)*
ELiTe GALAXY - ABI	Whole blood	171 gEq/mL	100% (32/32)*	100% (36/36)*
	Plasma	119 gEq/mL	100% (30/30)*	100% (34/34)*
	CSF	10 gEq/reaction	100% (21/21)*	100% (22/22)*

*confirmed samples/tested samples

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, CSF	200 µL	700 µL	100 µL	200 µL
ELITE Galaxy	WB, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	CSF, Plasma	500 µL	-	100 µL	5 µL
QIAasympphony	Plasma	500 µL	700 µL	85 µL	10 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

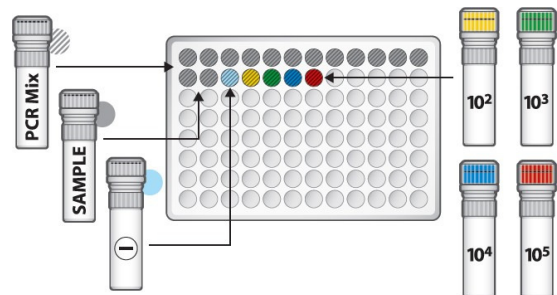
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "HSV2" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition 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
45 cycles	72°C	20 sec

The melt curve analysis is optional, refer to the complete IFU

Amplification - PCR Set -up

1. Thaw HSV2 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 – Baseline and Threshold for qualitative analysis

Instrument	Baseline	HSV2 FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	6 - 15	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	6 - 15	0.1	0.05

Interpretation - Qualitative results

HSV2 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 HSV2 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 cp/reaction or approximately from 100 to 10⁷ cp/mL.

HSV2 ELITE MGB® Kit used with Cobas-Z 480 PCR instruments

Ref.: RTS032PLD



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 «**HSV2 ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for **the detection and quantification of the DNA of type 2 Herpes Simplex human virus (HSV2)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV2 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. 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
HSV2	Glicoprotein G (gpG)	FAM
Internal Control	human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

- › **Whole blood** EDTA
- › **Plasma** EDTA

D. Kit content

HSV2 Q-PCR Mix



X 4

Ready-to-use PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL
100 reactions per kit
5 freeze-thaw cycles per tube

- › 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**, software 1.0
- › **HSV2 - ELITE Positive Control**: CTR032PLD
- › **HSV2 ELITE Standard**: STD032PLD
- › **CPE Internal Control**: CTRCPE

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole blood	10 cp/reaction	100% (30/30)*	100% (40/40)*
	Plasma	10 cp/reaction	100% (30/30)*	100% (34/34)*

*confirmed samples/tested samples

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, Plasma	200 µL	350 µL	100 µL	20 µL

Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments

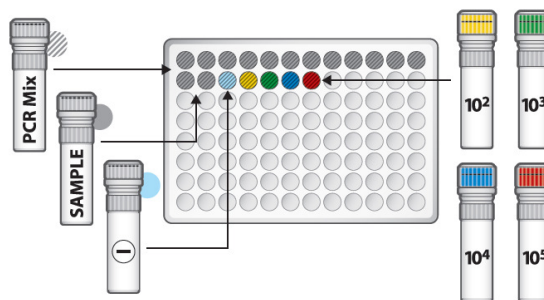
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "HSV2" detector with "FAM" and quencher "465 - 510"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "540 -580"

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

The melt curve analysis is optional, refer to the complete IFU

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw HSV2 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 – Background and Threshold for qualitative analysis*

Instrument	Matrix	Background	HSV2 FAM	Internal Control VIC
Cobas-Z 480 PCR instruments	Plasma	2 - 6	0.55	1.2
Cobas-Z 480 PCR instruments	WB	2 - 6	0.8	1.5

**manually set the Threshold and Noiseband*

Interpretation - Qualitative results

HSV-1 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 HSV2 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 copies/reaction or approximately from 100 to 10⁷ copies/mL.

FOLHA DE TRABALHO

[illegible]