

Instructions for use

HSV2 ELITe MGB® Kit

reagentes para PCR em tempo real do ADN



REF RTS032PLD

UDI 08033891483593

CE IVD
0123

HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES

Rev.	Aviso de alteração	Dados (dd/mm/aaaa)
19-R	<p>Atualização para conformidade com o Regulamento (UE) 2017/746 em matéria de requisitos de dispositivo médico para diagnóstico in vitro (IVDR).</p> <p>Upgrade dos desempenhos analíticos e de diagnóstico no parágrafo CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO</p> <p>Atualização da utilização prevista:</p> <ul style="list-style-type: none"> Validação dos produtos em associação com os instrumentos ELITe InGenius (REF INT030) e ELITe BeGenius (REF INT040) com matrizes de sangue total, plasma e LCR. Validação dos produtos em associação com a matriz de sangue total e os seguintes instrumentos: ELITe GALAXY e instrumento ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR. <p style="text-align: center;">NOTE</p> <p>A composição do produto permanece inalterada.</p> <p>Novos gráficos e definição de conteúdos das instruções de utilização.</p>	19/05/25
18	<ul style="list-style-type: none"> Atualização para a utilização do produto para matriz de LCR em associação com o instrumento «ELITe BeGenius®» (REF INT040); Atualização do valor-limite de Ct do Internal Control em associação com «ELITe InGenius®» (REF INT030) e «ELITe BeGenius®» (REF INT040) 	28/10/22
17	<p>Atualização para a utilização do produto em associação com o instrumento □ELITe BeGenius □ (REF INT040).</p> <p>Atualização de CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO (pág.22):</p> <ul style="list-style-type: none"> Alteração no limite de deteção (LdD) Adição do intervalo de medição linear Adição da repetibilidade Adição da reprodutibilidade 	28/01/22
16	Utilização extensiva do produto com a plataforma Roche cobas z 480 analyzer.	15/06/20
15	O número de tubos e de volume de Positive Control (ref. CTR032PLD) foi alterado: de 4 x 65 µL para 2 x 160 µL.	28/07/17
00— 14	Desenvolvimento de novo produto e alterações subsequentes.	-

NOTE

Os seguintes lotes de produtos continuam disponíveis no mercado em virtude do IVDR até às suas datas de expiração, de acordo com o Artigo 110 de IVDR. Caso esteja na posse destes lotes de produtos, contacte a equipa ELITechGorup para solicitar a versão anterior das instruções de utilização

REF. PRODUTO	Número de lote	Data de expiração
RTS032PLD	U0125-116	31/01/2027
RTS032PLD	U0724-004	30/06/2026
RTS032PLD	U0324-114	30/11/2025
RTS032PLD	U1123-019	31/08/2025

ÍNDICE

1 UTILIZAÇÃO PREVISTA	4
2 PRINCÍPIOS DO ENSAIO	4
3 DESCRIÇÃO DO PRODUTO	4
4 MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO	5
5 MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO	5
6 OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS	5
7 AVISOS E PRECAUÇÕES	6
8 AMOSTRAS E CONTROLOS para o ELITe InGenius e ELITe BeGenius	8
9 PROCEDIMENTO do ELITe InGenius	11
10 PROCEDIMENTO do ELITe BeGenius	19
11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITe InGenius e ELITe BeGenius	24
12 AMOSTRAS E CONTROLOS PARA O Instrumento ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR	34
13 PROCEDIMENTO do instrumento ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR	34
14 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O Instrumento ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR	40
15 REFERÊNCIAS	42
16 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	42
17 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	43
18 SÍMBOLOS	48
19 NOTIFICAÇÃO PARA OS UTILIZADORES	48
20 NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	48
Appendix A QUICK START GUIDE	50
Appendix B QUICK START GUIDE	55

1 UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto **HSV2 ELITE MGB® Kit** consiste num dispositivo médico de diagnóstico *in vitro* que se destina a ser usado por profissionais de saúde como um ensaio quantitativo de PCR em tempo real de ácidos nucleicos para a **deteção e a quantificação do ADN do vírus Herpes Simplex tipo 2 (HSV2)** extraído de amostras clínicas.

O ensaio foi validado em associação com os instrumentos **ELITE InGenius®** e **ELITE BeGenius®**, sistemas automatizados e integrados para a extração, a PCR em tempo real e a interpretação dos resultados, usando amostras de sangue total colhido em EDTA, e plasma colhido em EDTA e líquido cefalorraquidiano (LCR).

O ensaio está também validado em associação com o **ELITE GALAXY**, sistema automático de extração e configuração de PCR e o **instrumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR**, plataforma de PCR em tempo real, usando amostras humanas de sangue total colhido em EDTA.

O produto destina-se a ser utilizado como um auxílio no diagnóstico monitorização de infeções por HSV2 em pacientes com suspeita de infeção ou sujeitos a monitorização de infeção por HSV2.

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

2 PRINCÍPIOS DO ENSAIO

O ensaio consiste na PCR em tempo real para a deteção de ADN de HSV2, isolado de amostras e amplificado usando o reagente de ensaio **HSV2 Q-PCR Mix** que contém primers e sondas com a tecnologia ELITE MGB®.

As sondas ELITE MGB são ativadas quando hibridizam com os correspondentes produtos da PCR. **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** monitorizam o aumento da fluorescência e calculam os ciclos de limite (Ct) e as temperaturas de fusão (Tm). A quantidade de HSV2 é calculada com base numa curva de calibração armazenada.

O **instrumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR** mede e regista o aumento da emissão da fluorescência. O processamento de dados subsequentes permite a deteção e a quantificação de HSV2 na amostra primária.

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

3 DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O **HSV2 ELITE MGB Kit** fornece o reagente do ensaio **HSV2 Q-PCR Mix**, uma mistura de PCR otimizada e estabilizada que contém os primers e sondas específicos de:

- **Região específica de gpG**, detetada no canal HSV2; a sonda é estabilizada pela tecnologia ELITE MGB, inativada por uma molécula não fluorescente e identificada com o corante FAM.
- Internal Control, específico para o **promotor e a região 5' UTR do gene da beta-globina humana**, detetado no Canal **IC**; a sonda é estabilizada pela tecnologia ELITE MGB, inativada pelo Eclipse Dark Quencher e identificada pelo corante AquaPhluor® 525 (AP525).

A **HSV2 Q-PCR Mix** também contém 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 **HSV2 ELITE MGB Kit** contém reagentes suficientes para **96 testes** no **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** com **20 µL** usados por reação.

O produto **HSV2 ELITE MGB Kit** contém reagentes suficientes para **100 testes noutros sistemas**, com **20 µL** usados por reação.

NOTE

Um fator de conversão permite exprimir os resultados da análise quantitativa em unidades internacionais do HSV2 de acordo com o "1st WHO International Standard for HSV2 DNA" (NIBSC ref. 17/122, Reino Unido).

4 MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Table 1

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
HSV2 Q-PCR Mix ref. RTS032PLD	Mistura de reagentes para o tubo de PCR em tempo real com tampa NATURAL	4 x 540 µL	-

5 MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- Exaustor de fluxo de ar laminar.
- Luvas de nitrilo sem pó descartáveis ou material semelhante.
- Misturador de vórtice.
- Microcentrífuga de bancada (~5.000 RPM).
- Microcentrífuga de bancada (~13.000 RPM).
- Micropipetas e pontas estéreis com filtro de aerossol ou pontas de deslocação positiva estéreis (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Tubos com tampa de rosca esterilizados de 2,0 mL (Sarstedt, Alemanha, ref. 72.694.005).
- Água de qualidade para biologia molecular.

6 OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

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

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

Table 2

Instrumentos e software	Produtos e reagentes
<p>ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, ref. INT030)</p> <p>ELITe InGenius Software versão 1.3.0.19 (ou superior)</p> <p>HSV2 ELITe_STD, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para a análise dos Calibradores.</p> <p>HSV2 ELITe_PC, protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Positive Control</p> <p>HSV2 ELITe_NC, protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Negative Control</p> <p>HSV2 ELITe_WB_200_100, protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostra do sangue total</p> <p>HSV2 ELITe_PL_200_100, protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostra de plasma</p> <p>HSV2 ELITe_CSF_200_100, protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostra de LCR</p>	<p>ELITe InGenius SP200 (EG SpA, ref. INT032SP200)</p> <p>ELITe InGenius SP 200 Consumable Set (EG SpA, ref. INT032CS)</p> <p>ELITe InGenius PCR Cassette (EG SpA, ref. INT035PCR),</p> <p>ELITe InGenius Waste Box (EG SpA, ref. F2102-000)</p> <p>300 µL Filter Tips Axygen (Corning Life Sciences Inc., ref. TF-350-L-R-S) apenas com o ELITe InGenius</p> <p>1000 µL Filter Tips Tecan (Tecan, Suíça, ref. 30180118) com o ELITe BeGenius apenas</p> <p>CPE - Internal Control (EG SpA, ref. CTCRCPE)</p> <p>HSV2 - ELITe Standard (EG SpA, ref. STD032PLD)</p> <p>HSV2 - ELITe Positive Control (EG SpA, ref. CTR032PLD)</p>
<p>ELITe BeGenius (EG SpA ref. INT040)</p> <p>ELITe BeGenius Software versão 2.2.1 (ou superior)</p> <p>HSV2 ELITe_Be_STD, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para análise de Calibradores</p> <p>HSV2 ELITe_Be_PC, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para análise do Positive Control.</p> <p>HSV2 ELITe_Be_NC, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para análise do Negative Control</p> <p>HSV2 ELITe_Be_WB_200_100, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para análise de amostra do sangue total</p> <p>HSV2 ELITe_Be_PL_200_100, Protocolo de Ensaio com parâmetros para análise de amostra de plasma</p> <p>HSV2 ELITe_Be_CSF_200_100, protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostra de LCR</p>	<p>ELITe GALAXY 300 Extraction Kit (EG SpA, ref. INT021EX).</p> <p>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 selantes adesivas para amplificação em tempo real</p> <p>CPE – Internal Control (EG SpA, ref. CTCRCPE)</p> <p>HSV2 - ELITe Standard (EG SpA, ref. STD032PLD)</p> <p>HSV2 - ELITe Positive Control (EG SpA, ref. CTR032PLD)</p>
<p>7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, ref. 4406985)</p> <p>ELITe GALAXY (EG SpA, ref. INT020) com a versão de software 1.3.1 (ou posterior).</p> <p>Protocolo de extração para o ELITe GALAXY, xNA Extraction (Universal)</p>	<p>ELITe GALAXY 300 Extraction Kit (EG SpA, ref. INT021EX).</p> <p>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 selantes adesivas para amplificação em tempo real</p> <p>CPE – Internal Control (EG SpA, ref. CTCRCPE)</p> <p>HSV2 - ELITe Standard (EG SpA, ref. STD032PLD)</p> <p>HSV2 - ELITe Positive Control (EG SpA, ref. CTR032PLD)</p>

7 AVISOS E PRECAUÇÕES

Este produto foi concebido para utilização exclusiva in-vitro.

7.1 Avisos e precauções gerais

Manuseie e elimine todas as amostras biológicas como se fossem infecciosas. Evite o contacto direto com as amostras biológicas. Evite salpicos ou vaporizações. Tubos, pontas e outros materiais que entrarem em contacto com as amostras biológicas devem ser tratados durante, pelo menos, 30 minutos com hipoclorito de sódio (lixívia) a 3% ou em autoclave durante uma hora a 121 °C antes da eliminação.

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

- Use vestuário e luvas de proteção adequados e proteja os olhos e o rosto.
- Nunca deve pipetar soluções com a boca.
- Não coma, beba, fume ou aplique produtos cosméticos nas áreas de trabalho.
- Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.
- Elimine os reagentes remanescentes e os desperdícios em conformidade com os regulamentos em vigor.
- Leia atentamente todas as instruções fornecidas antes de efetuar o ensaio.
- Durante a realização do ensaio, siga as instruções fornecidas com o produto.
- Não utilize o produto após a data de validade indicada.
- Use apenas os reagentes fornecidos com o produto e os recomendados pelo fabricante.
- Não use reagentes de lotes diferentes.
- Não use reagentes de outros fabricantes.

7.2 Avisos e precauções para biologia molecular

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

Nunca transfira batas, luvas ou ferramentas de laboratório da área designada para a amplificação/deteção de produtos de amplificação para a área designada para a extração/preparação de reações de amplificação.

Quando a sessão de amplificação tiver sido realizada com o instrumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR, é necessário ter disponíveis áreas separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação. Nunca introduza um produto de amplificação na área designada para a extração/preparação de reações de amplificação.

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

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

Os reagentes devem ser manuseados sob uma câmara de fluxo laminar. As pipetas usadas no manuseamento dos reagentes devem ser usadas exclusivamente para este fim. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, estar livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

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

As PCR Cassette devem ser manuseadas com cuidado de modo a evitar a emissão do produto da PCR para o ambiente e a contaminação da amostra e do reagente.

7.3 Avisos e precauções específicos para os componentes

Table 3

Componente	Temperatura de armazenamento	Utilização a partir da primeira abertura	Ciclos de congelação/descongelação	Estabilidade de bordo (ELITe InGenius e ELITe BeGenius)
HSV2 Q-PCR Mix	-20°C ou inferior (protegido da luz)	um mês	até cinco	até cinco sessões separadas* de três horas cada ou até 7 horas consecutivas (2 sessões consecutivas de 3 horas cada e o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão)

*com congelamento intermédio.

8 AMOSTRAS E CONTROLOS para o ELITE InGenius e ELITE BeGenius

8.1 Amostras

Este produto destina-se a ser usado no instrumento **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** com o ácido nucleico extraído das seguintes amostras clínicas identificadas e manuseadas de acordo com as diretrizes laboratoriais, e colhidas, transportadas e armazenadas sob as condições seguintes:

Amostra	Requisitos de colheita	Condições de transporte/armazenamento			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2 / +8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Sangue total	EDTA	≤ 1 d	≤ 3 d	≤ 30 d	≤ 30 d
Plasma	EDTA	≤ 1 d	≤ 3 d	≤ 30 d	≤ 30 d
LCR	Evitar a contaminação do sangue do paciente	≤ 4 horas	≤ 4 horas	≤ 30 d	≤ 30 d

EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; d, dia.

Mesmo sendo possíveis períodos de armazenamento mais longos a -70 ° C, conforme o extensivamente indicado pela literatura científica, a sua aplicação deve ser avaliada internamente pelos utilizadores finais deste produto.

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

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

Table 4

Amostra	Instrumento	Nome do protocolo de ensaio	Relatório	Características
Sangue total com EDTA	ELITE InGenius	HSV2 ELITE_WB_200_100	cópias/mL ou IU/mL	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
	ELITE BeGenius	HSV2 ELITE_Be_WB_200_100	cópias/mL ou IU/mL	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 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
Plasma em EDTA	ELITE InGenius	HSV2 ELITE_PL_200_100	cópias/mL ou IU/mL	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
	ELITE BeGenius	HSV2 ELITE_Be_PL_200_100	cópias/mL ou IU/mL	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 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
LCR	ELITE InGenius	HSV2 ELITE_CSF_200_100	cópias/mL ou IU/mL	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
	ELITE BeGenius	HSV2 ELITE_Be_CSF_200_100	cópias/mL ou IU/mL	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 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

UI, unidades internacionais

NOTE

Verifique se o tubo primário e o volume da amostra são compatíveis com o ELITE InGenius ou o ELITE BeGenius, seguindo as instruções de utilização do kit de extração **ELITE InGenius SP200** (EG SpA, ref. INT032SP200)

O volume da amostra num tubo primário varia consoante 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.

Se necessário, 200 µL de amostra devem ser transferidos para o tubo de extração (para o ELITE InGenius) ou para o tubo Sarstedt de 2 mL (para o ELITE BeGenius).

NOTE

A pipetagem de amostras para o **tubo de extração** ou para o **tubo Sarstedt de 2 mL** pode **gerar contaminação**. Utilize as pipetas adequadas e siga todas as recomendações reportadas na secção "7 AVISOS E PRECAUÇÕES page 6".

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

Consulte "Substâncias Potencialmente Interferentes" na secção [11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITE InGenius e ELITE BeGenius page 24](#) para verificar os dados relativos a substâncias interferentes.

NOTE

Não use amostras colhidas em heparina, a qual é um conhecido inibidor da transcrição reversa e da PCR.

8.2 Calibradores e controlos da PCR

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

- Para a curva de calibração, utilize os quatro níveis de produto **HSV2 ELITE Standard** (não fornecido com este kit) com os protocolos do ensaio **HSV2 ELITE STD** ou **HSV2 ELITE Be STD**.

NOTE

As concentrações de Q – PCR Standards são expressas em cópias/reação (10⁵ cópias / rxn, 10⁴ cópias / rxn, 10³ cópias / rxn, 10² cópias / rxn). Consulte "Incerteza da curva de standard" na secção 11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITE InGenius e ELITE BeGenius page 24.

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

- Para o Positive Control, use o produto **HSV2 - ELITE Positive Control** (não fornecido com este kit) com os protocolos de ensaio **HSV2 ELITE_PC** ou **HSV2 ELITE_Be_PC**.
- Para o Negative Control, utilize água de grau biológico molecular (não fornecida com este kit) com os protocolos de ensaio **HSV2 ELITE_NC** ou **HSV2 ELITE_Be_NC**.

NOTE

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

As curvas de validação expiram após **60 dias** e, nesse momento, é necessário voltar a executar a calibração.

Os resultados do controlo da PCR expiram após **15 dias** e, nesse momento, é necessário voltar a executar os controlos positivos e negativos.

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

- se for usado um novo lote de reagentes,

- Os resultados da análise de controlo da qualidade se encontrarem fora da especificação (ver o parágrafo seguinte),
- for realizada qualquer manutenção ou assistência significativa nos instrumentos **ELITE InGenius** ou **ELITE BeGenius**.

8.3 Controlos da qualidade

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

9 PROCEDIMENTO do ELITE InGenius

O procedimento para uso do HSV2 ELITE MGB Kit com o ELITE InGenius é composto por três passos:

Table 5

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

9.1 PASSO 1 – Verificação da disponibilidade do sistema

Antes de iniciar a sessão:

- - ligue o **ELITE InGenius** e inicie sessão no modo “**CLOSED**” (fechado),
- no menu “Calibração” na página inicial, verifique se os Calibradores (**Q - PCR Standard**) estão aprovados e válidos (Estado) para o lote de PCR Mix a ser utilizado. Caso não haja calibradores válidos para o lote de PCR Mix, realize a calibração conforme descrito nas secções seguintes,
- no menu “Controls” (Controlos) na página inicial, verifique se os controlos de PCR (**Positive Control, Negative Control**) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de PCR Mix a ser utilizado. Caso não haja controlos de PCR válidos disponíveis para o lote da **PCR Mix** execute os controlos de PCR conforme descrito nas secções seguintes,
- escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela EG SpA (ver [8 “Amostras e Controlos” page 8](#)).

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

9.2 PASSO 2 – Configuração da sessão

O HSV2 ELITE MGB Kit pode ser usado no ELITE InGenius para realizar:

- Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR]),
- Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR]),
- Execução de calibração (apenas PCR),

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

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

NOTE

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

Antes de configurar uma execução:

Descongele os tubos **PCR Mix** necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para **24 testes**. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

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

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

	A. Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair +PCR])	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])
1	<p>Identifique amostras e, se necessário, descongele à temperatura ambiente, misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Se necessário, transfira 200 µL da amostra para um tubo de extração anteriormente identificado.</p> <p>Descongele os tubos de CPE necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Cada tubo é suficiente para 12 extrações.</p>	<p>Descongele o Elution tube (Tubo de eluição) contendo os ácidos nucleicos extraídos à temperatura ambiente. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.</p>
2	Selecione “Perform Run” (Executar) a partir do ecrã “Home”.	Selecione “Perform Run” (Executar) a partir do ecrã “Home”
3	Certifique-se de que o “Extraction Input Volume” (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o “Extracted Elute Volume” (“Volume de eluição do extraído”) é de 100 µL.	Certifique-se de que o “Extraction Input Volume” (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o “Extracted Elute Volume” (“Volume de eluição do extraído”) é de 100 µL.
4	Para cada amostra, atribua um Track e introduza a “SampleID” (SID) digitando ou lendo o código de barras da amostra.	Para cada amostra, atribua um Track e introduza a “SampleID” (SID) digitando ou lendo o código de barras da amostra.
5	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de ensaio) na coluna “Assay” (Ensaio) (ver “Amostras e Controlos”).	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna “Assay” (Ensaio) (ver “Amostras e Controlos”).
6	Certifique-se de que o “Protocol” (Protocolo) apresentado é: “Extract + PCR”(Extrair + PCR).	Selecione “PCR Only” (Apenas PCR) na coluna “Protocol” (Protocolo).
7	Selecione a posição de carregamento da amostra como “Primary tube” (Tubo primário) ou “Extraction Tube” (Tubo de extração) na coluna “Sample Position” (Posição da amostra). Certifique-se de que o “Dilution factor” (Fator de diluição) é “1”.	Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna “Sample Position” (Posição da amostra) é “Elution Tube (bottom row)” (Tubo de eluição [linha inferior]). Certifique-se de que o “Dilution factor” (Fator de diluição) é “1”.
8	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.

	A. Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair +PCR])	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])
9	Carregue a CPE e PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) em referência a "Load List" (Lista de carregamentos) e introduza o número de lote, data de validade e o número de reações da CPE and PCR Mix para cada tubo.	Carregue a PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) em referência a "Load List" (Lista de carregamentos) e introduza o número de lote, data de validade e o número de reações da PCR Mix para cada tubo.
10	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
11	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.
12	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
13	Carregue a PCR Cassette, os cartuchos de extração Elite InGenius SP 200 e todos os consumíveis e amostras necessários para serem extraídos	Carregue a PCR Cassette e o Elution Tubes (Tubos de eluição com as amostras extraídas.
14	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
15	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
16	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).

	C. Execução da calibração (PCR only [Apenas PCR])	D. Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [Apenas PCR])
1	Descongele os tubos de Q-PCR Standard tubes (Cal1: Q-PCR Standard 10 ² , Cal2: Q-PCR Standard 10 ³ , Cal3: Q-PCR Standard 10 ⁴ , Cal4: Q-PCR Standard 10 ⁵) à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.	Descongele os tubos de Positive Control à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Como Negative Control , transfira pelo menos 50 µL de água de qualidade para biologia molecular para um "Elution tube", fornecido com o ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home".	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home".
3	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 µL.	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 µL.
4	Para o Q-PCR Standard, atribua a "Track" (Calha), selecione o Assay Protocol (Protocolo de ensaio) (ver "Amostras e Controlos") na coluna "Assay" (Ensaio) e introduza o número de lote e a data de expiração do reagente.	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos"). Introduza o número do lote e a data de validade do Positive Control e da água de grau biológico molecular.
5	Certifique-se de que "PCR Only" (Apenas PCR) está selecionado na coluna "Protocol" (Protocolo).	Certifique-se de que "PCR Only" (Apenas PCR) está selecionado na coluna "Protocol" (Protocolo).
6	Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" (Posição da amostra) é "Elution Tube (bottom row)" (Tubo de eluição [linha inferior]).	Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" (Posição da amostra) é "Elution Tube (bottom row)" (Tubo de eluição [linha inferior]).
7	Carregue a PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) consultando a "Load List" (Lista de carregamento) e introduza o número de lote, data de validade e o número de reações da PCR Mix para cada tubo.	Carregue a PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) consultando a "Load List" (Lista de carregamento) e introduza o número de lote, data de validade e o número de reações da PCR Mix para cada tubo.
8	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
9	Verifique as pontas nos "Tip Rack (s)" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua o suporte(s) de pontas, se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Rack (s)" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua o suporte(s) de pontas, se necessário.
10	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
11	Carregue a PCR Cassette e os tubos de Q - PCR Standard.	Carregue a PCR Cassette , e o Positive Control e Negative Control.
12	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
13	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
14	Prima "Start" (Iniciar)	Prima "Start" (Iniciar).

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

NOTE

No final da execução a restante amostra extraída no **Elution tube** (Tubo de eluição) deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 ±10 °C durante não mais de um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

NOTE

No final da operação, a **PCR Mix** pode ser retirada do instrumento, tapada e armazenada a -20 °C ou abaixo ou pode ser mantida no bloco frigorífico durante até 7 horas (2 sessões de 3 horas cada e o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão), misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a próxima sessão.

NOTE

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

NOTE

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

NOTE

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

NOTE

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

NOTE

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

9.3 PASSO 3 - Revisão e aprovação dos resultados

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

No final da execução, é automaticamente apresentado o ecrã “Results Display” (Exibição dos resultados). Neste ecrã são mostrados os resultados e informações sobre a execução. A partir deste ecrã é possível aprovar o resultado, imprimir ou guardar os relatórios (“Sample Report” (Relatório da amostra) ou “Track Report” (Relatório da calha)). Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

NOTE

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

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

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

9.3.1 A. Validação da Curva de calibração

O **ELITe InGenius software** interpreta os resultados do PCR para o alvo das reações do Calibrador com os parâmetros do Assay Protocol (Protocolo de ensaio) **ELITe STD**. A Ct resultante versus a concentração produz a curva da calibração.

As curvas de calibração, específicas para o lote de reagente da PCR, são guardadas na base de dados (Calibração). Podem ser visualizados e aprovados pelos utilizadores “Administrator” (Administrador) ou “Analyst” (Analista), seguindo as instruções na GUI.

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

NOTE

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

9.3.2 Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação

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

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

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

The **ELITE InGenius software** processes the Positive Control and Negative Control results and generates Control Charts. São usados quatro resultados de Positive Control e do Negative Control aprovados para preparar o “Gráfico de controlo” inicial. Para controlos subsequentes, os resultados são analisados pelo software para garantir que os desempenhos do sistema se encontram dentro dos critérios de aceitação, mostrados nos traçados do Gráfico de controlo. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

NOTE

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

NOTE

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

9.3.3 Validação dos resultados da amostra

O **ELITE InGenius Software** interpreta os resultados de PCR para o alvo (Canal **HSV2**) e do Internal Control (Canal **IC**) com os parâmetros do protocolo de ensaio **HSV2 ELITE_WB_200_100** ou **HSV2 ELITE_PL_200_100** ou **HSV2 ELITE_CSF_200_100**. Os valores de Ct do alvo resultante são convertidos em concentração.

Os resultados são mostrados no ecrã “Result Display” (Exibição dos resultados).

Os resultados da amostra podem ser aprovados quando forem cumpridas 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
Negative Control de HSV2	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.

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

Resultado da execução da amostra	Interpretação
HSV2:DNA Detected, quantity equal to XXX copies / mL or IU / mL (HSV2:ADN detetado, quantidade igual a XXX cópias/mL ou IU/mL)	Foi detetado ADN de HSV2 na amostra no intervalo de medição de ensaio, a sua concentração é mostrada.
HSV2:DNA Detected, quantity below “LLoQ” copies / mL or IU / mL (HSV2:ADN detetado, quantidade abaixo de “LLoQ” cópias/ mL ou IU/mL)	Foi detetado ADN de HSV2 na amostra, a sua concentração é inferior ao ensaio Limite inferior de quantificação
HSV2:DNA Detected, quantity beyond “ULoQ” copies / mL or IU / mL (HSV2:ADN detetado, quantidade além de “ULoQ” cópias/ mL ou IU/mL)	Foi detetado ADN de HSV2 na amostra, a sua concentração é superior ao ensaio - limite superior de quantificação
HSV2:DNA Not Detected or below “LoD” copies / mL or IU / mL (HSV2:ADN não detetado ou abaixo de “LoD” cópias/mL ou IU/ 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.
Invalid - Retest Sample (Inválido-Testar novamente a amostra)	Resultado do ensaio inválido devido a falha do Controlo Interno (extração incorreta, transferência de inibidores). O teste deve ser repetido.

Amostras indicadas como “Invalid - Retest Sample” (Inválido - testar novamente amostra): caso, o ADN do Controlo Interno não foi detetado eficientemente devido a problemas nos passos de colheita, extração ou PCR da amostra (por ex. amostragem incorreta, 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” (ver [17 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS page 43](#)).

As amostras reportadas como “HSV2:DNA Not Detected or below “LoD” copies / mL or IU / mL” (HSV2:ADN não detetado ou abaixo de “LoD” cópias/mL ou IU/mL) são adequadas para análise mas não foi detetado 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 [11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITe InGenius e ELITe BeGenius page 24](#)).

Amostras positivas do ADN de HSV2 a uma concentração abaixo do Limite de Deteção (e Limite Inferior da Quantificação) do ensaio, se detetado, são relatadas como “HSV2:DNA Detected, quantity below LLoQ copies/ / mL or IU/mL” (HSV2:ADN detetado, quantidade abaixo de “LLoQ” cópias/mL ou IU/mL) (ver [11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITe InGenius e ELITe BeGenius page 24](#)).

Amostras positivas para ADN de HSV2 no intervalo de medição linear são detetadas e relatadas como “HSV2:DNA Detected, quantity equal to “XXX” copies/mL or IU/mL” (HSV2:ADN detetado, quantidade igual a “XXX” cópias/mL ou IU/mL) (ver [11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITe InGenius e ELITe BeGenius page 24](#)).

As amostras positivas de ADN de HSV2 que estejam acima do Limite Superior de Quantificação são comunicadas como “HSV2:DNA Detected, quantity beyond “ULoQ” copies/mL or IU/mL” (HSV2:ADN detetado, quantidade além de “ULoQ” cópias/mL ou IU/mL) (ver [11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITe InGenius e ELITe BeGenius page 24](#)) e não são adequadas para quantificação. Se necessário a amostra pode ser diluída antes da extração ou PCR e novamente testada de forma a serem obtidos resultados dentro do intervalo de medição linear do ensaio.

NOTE

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

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

9.3.4 Elaboração do relatório do resultado da amostra

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

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

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

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

10 PROCEDIMENTO do ELITe BeGenius

O procedimento para uso do HSV2 ELITe MGB Kit com o ELITe BeGenius é composto por três passos:

Table 6

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

10.1 PASSO 1 - Verificação da disponibilidade do sistema

Antes de iniciar a sessão:

- ligue o **ELITe BeGenius** e inicie sessão no modo "**CLOSED**" (fechado),
- no menu "Calibrações" na página inicial, verifique se os Calibradores (**Q - PCR Standard**) estão aprovados e válidos (Estado) para o lote de **PCR Mix** a ser utilizado. Caso não haja calibradores válidos para o lote **PCR Mix**, realize a calibração conforme descrito nas secções seguintes,
- no menu "Controlos" na página inicial, verifique se os controlos de PCR (**Positive Control, Negative Control**) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de **PCR Mix** a ser utilizado. Caso não haja controlos de PCR válidos disponíveis para o lote da **PCR Mix** execute os controlos de PCR conforme descrito nas secções seguintes,
- escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela EG SpA (consulte "Amostras e Controlos").

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

10.2 PASSO 2 – Configuração da sessão

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

- Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR]),
- Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR]),
- Execução de calibração (apenas PCR),
- Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [apenas PCR]).

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

NOTE

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

Antes de configurar uma execução:

Descongele os tubos **PCR Mix** necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para **24 testes**. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

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

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

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])
1	<p>Identifique amostras e, se necessário, descongele à temperatura ambiente, misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Se necessário, transfira 200 µL da amostra para um tubo Sarstedt de 2 mL anteriormente identificado.</p> <p>Descongele os tubos de CPE necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Cada tubo é suficiente para 12 extrações.</p>	<p>Descongele o Elution tube (Tubo de eluição) contendo os ácidos nucleicos extraídos à temperatura ambiente. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.</p>
2	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home".	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home"
3	Retire os Suportes da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.	Retire os "Racks" de "Lane 1, 2 and 3" (L1, L2, L3) da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação
4	Selecione o "Run mode": "Extract + PCR"(Extrair + PCR).	Selecione o "Run mode": "PCR Only".
5	Carregue as amostras no "Sample Rack" (Suporte da amostras). (Nota: quando os tubos secundários "2 mL Tubes" (Tubos de 2 mL) forem carregados, use adaptadores azuis para o "Sample Rack" (Suporte de amostras).	Carregue as amostras no "Elution Rack" (Rack de eluição).
6	Insira o "Sample Rack" (Suporte da amostra) na "Cooler Unit" começando a partir da "Lane 5" (L5). Se necessário, insira a "Sample ID" (Identificação da amostra) (SID) para cada "Position" usada. Se forem carregados tubos secundários, assinale "2 mL Tube" (Tubo de 2 mL). Se os tubos secundários não possuírem código de barras, digite manualmente a "Sample ID").	Insira o "Elution Rack" (Rack de eluição) na "Cooler Unit" começando a partir da "Lane 3" (L3). Se necessário, para cada "Position" (Posição), insira a "Sample ID" (Identificação da amostra), a "Sample matrix" (Matriz da amostra), o "Extraction kit" (Kit de extração) e o "Extracted eluate vol." (Volume de eluato extraído).
7	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
8	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 µL.	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 µL.
9	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").
10	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
11	Quando forem processadas mais de 12 amostras, repita o procedimento a partir do ponto 6.	Quando forem processadas mais de 12 amostras, repita o procedimento a partir do ponto 6.
12	Coloque os "Elution tubes" no "Elution Rack" (os tubos de eluição podem ser etiquetados com código de barras para melhorar a capacidade de localização).	Não aplicável

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])
13	Insira o "Elution Rack" na "Cooler Unit" começando a partir da "Lane 3" (L3). Quando mais de 12 amostras forem processadas, repita usando a "Lane 2" (L2).	Não aplicável
14	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Não aplicável
15	Carregue o CPE e a PCR Mix no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).	Carregue a PCR Mix no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).
16	Insira o "Reagent/Elution Rack" na "Cooler Unit" na "Lane 2" (L2) se estiver disponível, ou na "Lane 1" (L1). Se necessário, para cada PCR Mix e/ou CPE, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).	Insira o "Reagent/Elution Rack" na "Cooler Unit" na "Lane 2" (L2) se estiver disponível, ou na "Lane 1" (L1). Se necessário, para cada PCR Mix, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).
17	Selecione "Next" (Próximo) para continuar	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
18	Verifique as pontas nos "Tip Rack(s)" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua o suporte (s) de pontas, se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Rack (s)" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua o suporte(s) de pontas, se necessário.
19	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
20	Coloque o "PCR Rack" com a "PCR Cassette" na Inventory Area (área dos reagentes).	Coloque o "PCR Rack" com a "PCR Cassette" na Inventory Area (área dos reagentes).
21	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
22	Carregue o "Extraction Rack" (Rack de extração) com os cartuchos de extração "ELITe InGenius SP 200" e os consumíveis de extração necessários.	Não aplicável
23	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
24	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).

	C. Execução da calibração (PCR only [Apenas PCR])	D. Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [Apenas PCR])
1	Descongele os tubos de Q-PCR Standard tubes (Cal1: Q-PCR Standard 10 ² , Cal2: Q-PCR Standard 10 ³ , Cal3: Q-PCR Standard 10 ⁴ , Cal4: Q-PCR Standard 10 ⁵) à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.	Descongele os tubos de Positive Control à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Como Negative Control , transfira pelo menos 50 µL de água de qualidade para biologia molecular para um "Elution tube", fornecido com o ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home".	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home".
3	Retire os "Racks" de "Lane 1, 2 and 3" (L1, L2, L3) da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.	Retire os "Racks" de "Lane 1, 2 and 3" (L1, L2, L3) da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
4	Selecione o "Run mode: PCR Only".	Selecione o "Run mode": "PCR Only".
5	Carregue os tubos de standard de Q-PCR no "Elution Rack" (Rack de eluição).	Carregue os tubos de Positive Control e Negative Control no "Elution Rack" (Rack de eluição).
6	Insira o "Elution Rack" (Rack de eluição) na "Cooler Unit" (Unidade refrigeradora) começando a partir da "Lane 3" (Via 3) (L3). Se necessário, para cada "Position" (Posição) introduza o "Reagent name" (Nome do reagente) e o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).	Insira o "Elution Rack" (Rack de eluição) na "Cooler Unit" (Unidade refrigeradora) começando a partir da "Lane 3" (Via 3) (L3). Se necessário, para cada "Position" (Posição) introduza o "Reagent name" (Nome do reagente) e o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).
7	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
8	Verifique o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) (200 µL) e o "Extracted Elute Volume" (Volume de eluato do extraído) (100 µL).	Verifique o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) (200 µL) e o "Extracted Elute Volume" (Volume de eluato do extraído) (100 µL).
9	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").
10	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
11	Carregue a PCR Mix no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).	Carregue a PCR Mix no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).
12	Insira o "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição) na "Cooler Unit" na "Lane 2" (L2) Se necessário, para cada PCR Mix, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).	Insira o "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição) na "Cooler Unit" na "Lane 2" (L2). Se necessário, para cada PCR Mix, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).
13	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
14	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua o suporte(s) de pontas, se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua o suporte(s) de pontas, se necessário.
15	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
16	Coloque o "PCR Rack" (Rack de PCR) com a " PCR Cassette " na Inventory Area (área dos reagentes).	Coloque o "PCR Rack" (Rack de PCR) com a " PCR Cassette " na Inventory Area (área dos reagentes).
17	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.

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

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

NOTE

No final da execução a restante amostra extraída no “**Elution tube**” (Tubo de eluição) deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 ± 10 °C durante não mais de um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

NOTE

No final da operação, a **PCR Mix** pode ser retirada do instrumento, tapada e armazenada a -20 °C ou abaixo ou pode ser mantida no bloco frigorífico durante até 7 horas (2 sessões de 3 horas cada e o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão), misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a próxima sessão.

NOTE

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

NOTE

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

NOTE

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

NOTE

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

NOTE

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

10.3 PASSO 3 - Revisão e aprovação dos resultados

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

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

NOTE

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

O **ELITE BeGenius** gera os resultados com o **HSV2 ELITE MGB Kit** através do seguinte procedimento:

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

NOTE

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

11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITE InGenius e ELITE BeGenius

11.1 Limite de detecção (LdD)

O Limite de Detecção (LdD) do ensaio em associação com sangue total colhido em EDTA foi determinado no instrumento **ELITE BeGenius**, testando um painel de matrizes negativas para HSV2 reforçadas com o material de referência de HSV2 (1st WHO International Standard for HSV2 Virus DNA, NIBSC ref.^a 17/122, Reino Unido). Foi executada a análise de regressão Probit nos resultados, e estimou-se como LdD a concentração correspondente a 95% de probabilidade de um resultado positivo.

Os resultados para sangue total colhido em EDTA são comunicados nas tabelas seguintes.

Table 7 Limite de detecção com ELITE InGenius e ELITE BeGenius (IU/mL)

Matriz	LdD	intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
Sangue total em EDTA	33	23	63

Os resultados obtidos confirmaram a alegada concentração para o alvo de HSV2 ELITE MGB Kit tanto no ELITE InGenius como no ELITE BeGenius para a matriz de sangue total colhido em EDTA.

A sensibilidade analítica como cópias/mL para matriz de sangue total colhido em EDTA é calculada através da aplicação do fator de conversão específico reportado no parágrafo [11.10 Fator de conversão para unidades internacionais page 31](#)

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

Table 8 Limite de detecção com ELITE InGenius e ELITE BeGenius (cópias/mL)

Matriz	LdD	intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
Sangue total em EDTA	165	115	315

O limite de detecção (LdD) do ensaio em associação com plasma colhido em EDTA e matrizes de líquido cefalorraquidiano foi determinado nos instrumentos ELITE GALAXY e 7500 FAST DX e verificado nos instrumentos **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** testando 20 réplicas de amostras reforçadas com material de referência de HSV2 (1st WHO International Standard for HSV2 DNA, NIBSC ref.17/122, Reino Unido).

Os resultados para as matrizes de plasma colhido em EDTA e LCR são comunicados nas tabelas seguintes.

Table 9 Limite de detecção com ELITE InGenius e ELITE BeGenius (IU/mL)

Matriz	LdD
	InGenius
plasma EDTA	12
LCR	24

Os resultados obtidos confirmaram a alegada concentração para o alvo de HSV2 ELITE MGB Kit tanto no ELITE InGenius como no ELITE BeGenius para plasma colhido em EDTA e LCR.

A sensibilidade analítica como cópias/mL para matriz de plasma colhido em EDTA e LCR é calculada através da aplicação do fator de conversão específico reportado no parágrafo [11.10 Fator de conversão para unidades internacionais page 31](#)

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

Table 10 Limite de detecção com ELITE InGenius e ELITE BeGenius (cópias/mL)

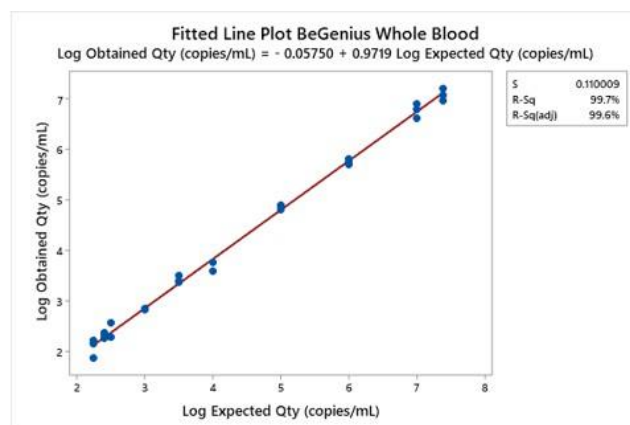
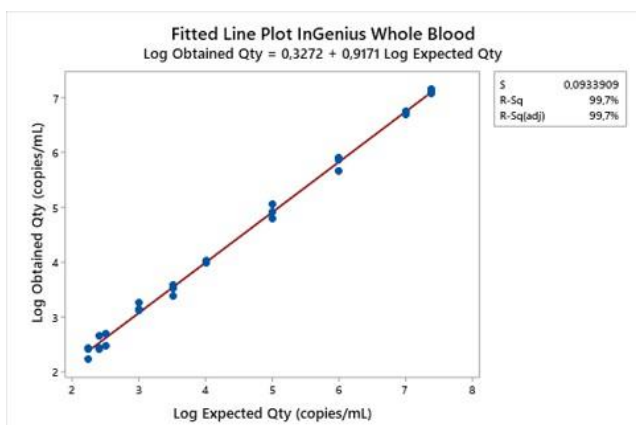
Matriz	LdD
	InGenius
plasma EDTA	119
LCR	119

11.2 Intervalo de medição linear e Limites de quantificação

O intervalo de medição linear do ensaio foi determinado em associação com amostras de sangue total, plasma colhido em EDTA e líquido cefalorraquidiano no **ELITE InGenius** e no **ELITE BeGenius**, utilizando um painel de material de referência do HSV2 (Herpes Simplex Virus Type 2 Culture Fluid Heat Inactivated, ZeptoMetrix em associação com sangue total em EDTA e LCR; 1st WHO International Standard for HSV2 DNA, NIBSC ref.17/122, Reino Unido, em associação com plasma em EDTA) em matrizes negativas para o ADN do HSV2.

Os resultados de cada matriz são comunicados nos parágrafos seguintes.

Sangue Total:

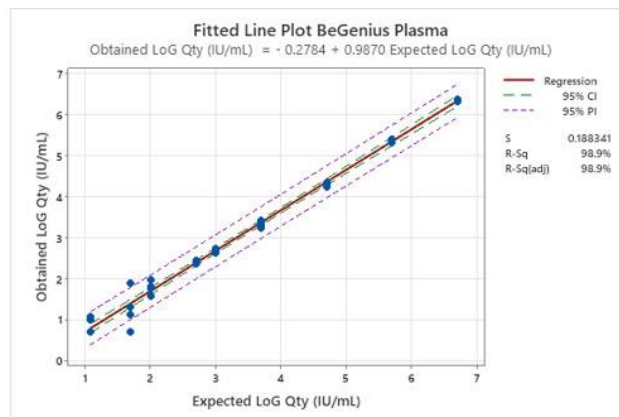
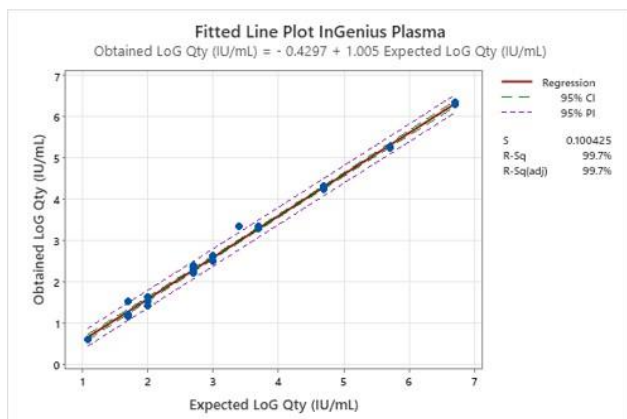


O intervalo de medição linear como cópias/mL para sangue total em EDTA é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado no parágrafo [11.10 Fator de conversão para unidades internacionais page 31](#)

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Table 11 Intervalo de medição linear para amostras de sangue total e o ELITe InGenius e ELITe BeGenius

Unidade	Limite inferior	Limite superior
IU/mL	33	5.000.000
cópias/mL	165	25.000.000

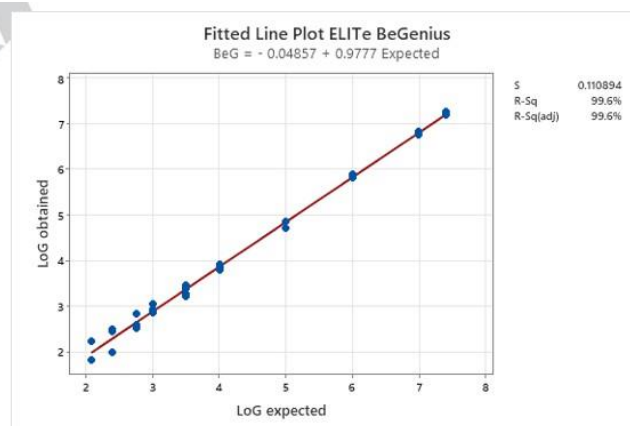
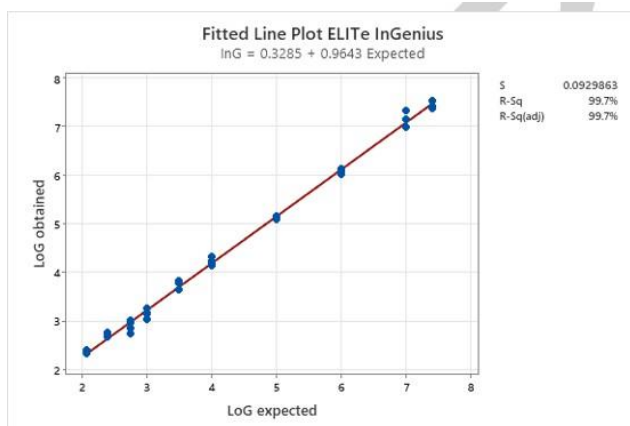
Plasma:

O intervalo de medição linear como cópias/mL para plasma colhido em EDTA é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado no parágrafo [11.10 Fator de conversão para unidades internacionais page 31](#)

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Table 12 Intervalo de medição linear para amostras de plasma e o ELITe InGenius e ELITe BeGenius

Unidade	Limite inferior	Limite superior
IU/mL	12	2.500.000
cópias/mL	119	25.000.000

LCR:

O intervalo de medição linear como cópias/mL para LCR é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado no parágrafo [11.10 Fator de conversão para unidades internacionais page 31](#)

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Table 13 Intervalo de medição linear para amostras de LCR e o ELITE InGenius e ELITE BeGenius

Unidade	Limite inferior	Limite superior
IU/mL	24	5.000.000
cópias/mL	119	25.000.000

11.3 Incerteza da curva de standard

O valor da incerteza da curva de standard foi calculado combinando os erros aleatórios (DP) das quantificações de todos os níveis e multiplicando o fator de cobertura $k = 2$ (incerteza combinada alargada) e é igual a 0,3977 Log cópias / reação.

Table 14

Níveis da curva de standard	Obtido	SD	Incerteza combinada alargada
	Log c/rxn		
HSV2 Q - PCR Standard 10 ⁵	5,0262	0,0882	0,3977
HSV2 Q - PCR Standard 10 ⁴	3,9339	0,1056	
HSV2 Q - PCR Standard 10 ³	2,9061	0,1192	
HSV2 Q - PCR Standard 10 ²	1,8536	0,0801	

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

A inclusividade do ensaio, como eficiência de detecção de diferentes genótipos de HSV2 foi avaliada por análise *in silico* das sequências disponíveis nas bases de dados de nucleótidos. A análise revelou a conservação da sequência e a ausência de mutações significativas. Assim, espera-se uma detecção eficiente para as diferentes estirpes ou isolados.

11.5 Marcadores potencialmente interferentes: Reatividade cruzada

A potencial reatividade cruzada de organismos não pretendidos que podem ser encontrados em amostras clínicas foi avaliada através de análise *in silico*. A análise não demonstrou homologias significativas com outros organismos não pretendidos (vírus, bactérias, protozoários e fungos). Por conseguinte, não é esperada qualquer reatividade cruzada.

11.6 Marcadores potencialmente interferentes: Inibição

A potencial inibição de organismos não pretendidos que podem ser encontrados em amostras clínicas foi avaliada através de análise *in silico*. A análise não demonstrou homologias significativas com outros organismos não pretendidos (vírus, bactérias, protozoários e fungos). Por conseguinte, não é esperada qualquer inibição.

11.7 Substâncias potencialmente interferentes: Inibição

A potencial inibição por substâncias interferentes (endógenas e exógenas) que podem ser encontradas em amostras clínicas foi avaliada para o ensaio através da análise de um painel de substâncias em concentração relevante em amostras positivas para HSV2.

Os resultados de cada matriz são comunicados nos parágrafos seguintes.

Table 15 Sangue Total

Amostras	Pos./Rep. HSV2	Resultado
Azitromicina	5/5	Sem interferência
Ganciclovir	5/5	Sem interferência
Etanol	5/5	Sem interferência
Ampicilina	5/5	Sem interferência
Fluconazol	5/5	Sem interferência
Ciclosporina A	5/5	Sem interferência
Aciclovir	5/5	Sem interferência
Vancomicina	5/5	Sem interferência
Heparina	5/5	Sem interferência
EDTA	5/5	Sem interferência

As substâncias testadas não interferem com a amplificação do HSV2 ou do Internal Control utilizando o HSV2 ELITe MGB Kit em amostras de sangue total em EDTA.

Table 16 Plasma

Amostras	Pos./Rep. HSV2	Resultado
Painel 1 Plasma em EDTA	5/5	Sem interferência
Painel 2 Sangue hemolítico baixo	5/5	Sem interferência
Painel 3 Sangue hemolítico médio	5/5	Sem interferência
Painel 4 Sangue hemolítico alto	5/5	Sem interferência
Painel 5 Plasma heparinizado	5/5	Interferência (Internal Control)
Painel 6 Plasma lipêmico	5/5	Sem interferência
Painel 7 Plasma icterico	5/5	Sem interferência

O teste demonstrou que todas as substâncias, com exceção da heparina, não interferem com a detecção e quantificação do alvo HSV2 ou Internal Control utilizando o HSV2 ELITe MGB Kit em amostras de plasma.

Table 17 LCR

Amostras	Pos./Rep. HSV2	Resultado
Azitromicina	5/5	Sem interferência
Ganciclovir	5/5	Sem interferência
Etanol	5/5	Sem interferência
Ampicilina	5/5	Sem interferência
Fluconazol	5/5	Sem interferência
Ciclosporina A	5/5	Sem interferência
Aciclovir	5/5	Sem interferência

Table 17 LCR (continued)

Amostras	Pos./Rep. HSV2	Resultado
Vancomicina	5/5	Sem interferência
Sangue total humano	5/5	Sem interferência

As substâncias testadas não interferem com a amplificação do HSV2 ou do Internal Control utilizando o HSV2 ELITE MGB Kit em amostras de LCR.

11.8 Repetibilidade

A repetibilidade intra-sessão e inter-sessão do ensaio foi avaliada no ELITE InGenius e no ELITE BeGenius através da análise de um painel de amostras de sangue total colhido em EDTA, incluindo uma amostra negativa e duas amostras reforçadas com material de referência certificado de HSV2 (Herpes Simplex Virus Type 2 Culture Fluid Heat Inactivated, ZeptoMetrix).

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

Table 18 Repetibilidade intrasessão no ELITE InGenius

Amostra	HSV2				
	N	Ct médio	SD	% CV	% Concordância
Negativo	8	-	-	-	100%
3 x LdD	8	35,65	0,87	2,45	100%
10 x LdD	8	33,96	0,20	0,58	100%

Table 19 Repetibilidade intrasessão no ELITE BeGenius

Amostra	HSV2				
	N	Ct médio	SD	% CV	% Concordância
Negativo	8	-	-	-	100%
3 x LdD	8	37,60	0,69	1,84	100%
10 x LdD	8	35,57	1,07	3,01	100%

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

Table 20 Repetibilidade intersessão no ELITE InGenius

Amostra	HSV2 ELITE MGB Kit - Dias 1-2				
	N	Ct médio	DP de Ct	% CV Ct	% Concordância
Negativo	16	-	-	-	100%
3 x LdD	16	35,87	0,71	1,99	100%
10 x LdD	16	33,92	0,22	0,66	100%

Table 21 Repetibilidade intersessão no ELITE BeGenius

Amostra	HSV2 ELITE MGB Kit - Dias 1-2				
	N	Ct médio	DP de Ct	% CV Ct	% Concordância
Negativo	16	-	-	-	100%
3 x LdD	16	37,59	0,66	1,75	100%
10 x LdD	16	35,41	0,84	2,37	100%

No teste de repetibilidade, o HSV2 ELITE MGB Kit detetou todas as amostras conforme esperado e apresentou uma variabilidade máxima dos valores de Ct do alvo como %CV inferior a 5%.

11.9 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do ensaio foi avaliada no ELITE InGenius e no ELITE BeGenius através da análise de um painel de amostras de sangue total colhido em EDTA negativas ou enriquecidas com material de referência de HSV2 (Herpes Simplex Virus Type 2 Culture Fluid Heat Inactivated, ZeptoMetrix).

Um resumo de reprodutibilidade interinstrumento (em dois instrumentos) é mostrado nas tabelas seguintes.

Table 22 Reprodutibilidade inter-instrumento no ELITE InGenius

Amostra	HSV2				
	N	Ct médio	SD	% CV	%Concordância
Negativo	8	-	-	-	100%
3 x LdD	8	36,33	0,55	1,51	100%
10 x LdD	8	34,46	0,29	0,86	100%

Table 23 Capacidade de reprodução interinstrumento no ELITE BeGenius

Amostra	HSV2				
	N	Ct médio	SD	% CV	%Concordância
Negativo	8	-	-	-	100%
3 x LdD	8	37,24	0,51	1,37	100%
10 x LdD	8	35,01	0,64	1,83	100%

Um resumo de reprodutibilidade interlote (em dois lotes) é mostrado nas tabelas seguintes:

Table 24 Repetibilidade interlote no ELITE InGenius

Amostra	HSV2				
	N	Ct médio	SD	% CV	%Concordância
Negativo	8	-	-	-	100%
3 x LdD	8	36,45	0,46	1,26	100%
10 x LdD	8	34,66	0,26	0,76	100%

Table 25 Repetibilidade interlote no ELITE BeGenius

Amostra	HSV2				
	N	Ct médio	SD	% CV	%Concordância
Negativo	8	-	-	-	100%
3 x LdD	8	36,90	0,58	1,59	100%
10 x LdD	8	35,17	0,49	1,39	100%

No teste de reprodutibilidade, o HSV2 ELITE MGB Kit detetou todas as amostras conforme esperado e apresentou uma variabilidade máxima dos valores de Ct do alvo como %CV inferior a 5%.

11.10 Fator de conversão para unidades internacionais

O fator de conversão para relatar os resultados quantitativos em unidades internacionais / mL começando por cópias / mL, foi calculado, para cada matriz, usando o material de referência calibrado e certificado (1st WHO International Standard for HSV2 DNA, NIBSC ref.17/122, Reino Unido).

Os resultados de cada matriz são resumidos na tabela seguinte

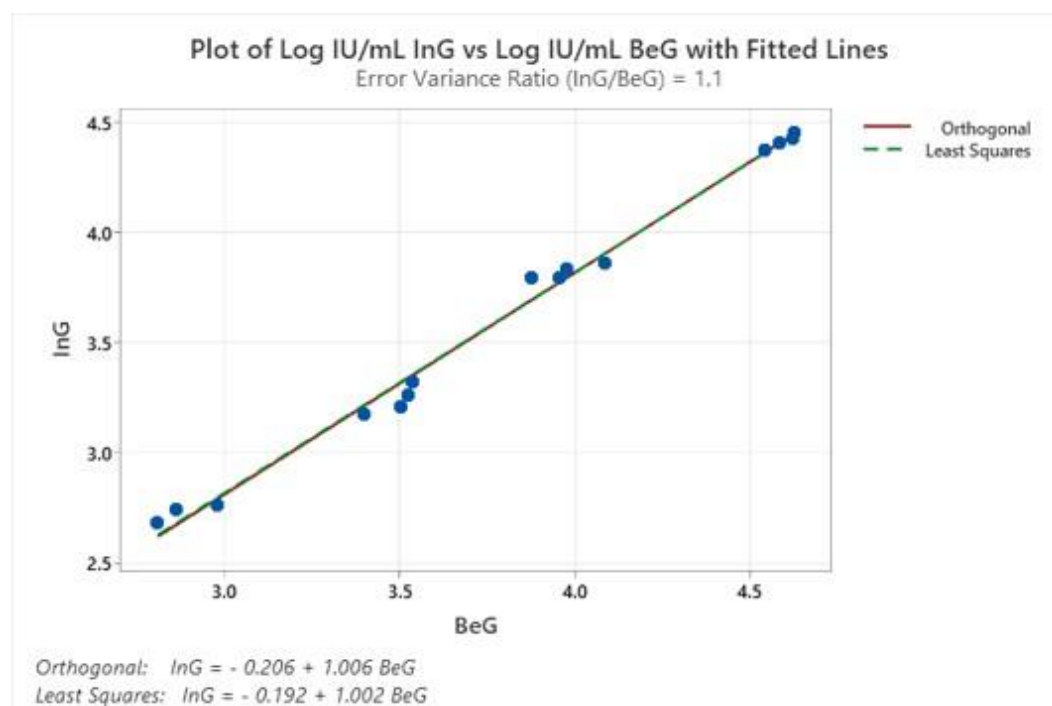
Table 26 Fator de conversão para unidades internacionais com ELITE InGenius

Matriz	Fc (IU/cópias)
sangue total em EDTA	0,2
plasma EDTA	0,1
LCR	0,2

Os resultados obtidos foram analisados por regressão ortogonal e linear para calcular a correlação.

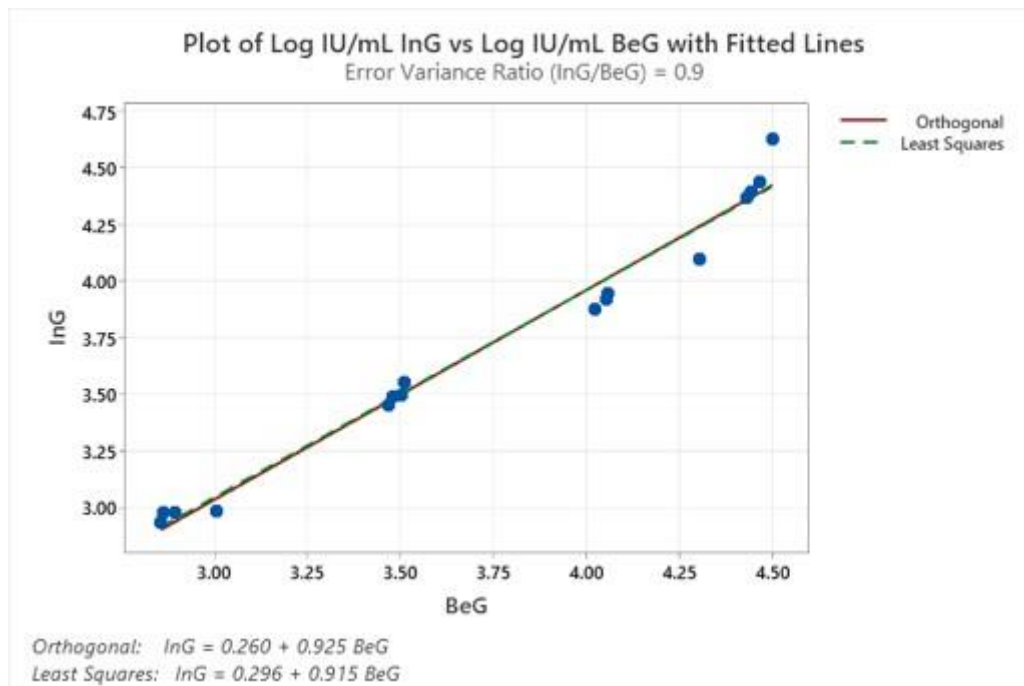
Os resultados de cada matriz são comunicados nos parágrafos seguintes.

Sangue total em EDTA



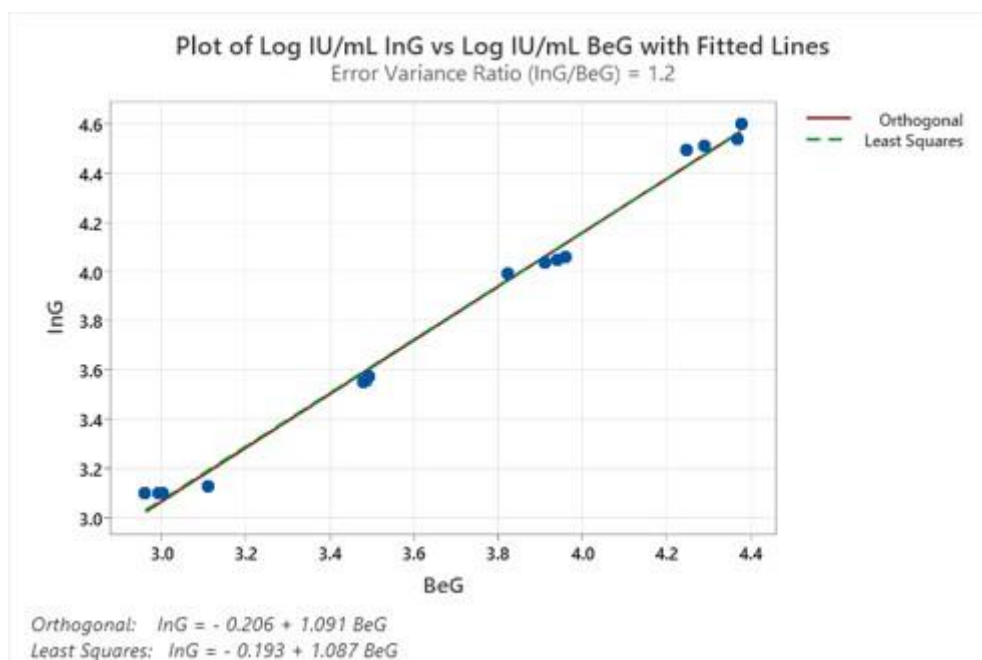
A análise de regressão ortogonal gerou um declive igual a -0,206 (95% CI: -0,3970; 0,0128) e um declive igual a 1,006 (95% CI: 0,9487; 1,0555).

Plasma



A análise de regressão ortogonal gerou um declive igual a 0,260 (95% CI: 0,006; 0,586) e um declive igual a 0,925 (95% CI: 0,8388; 0,9920).

LCR



A análise de regressão ortogonal gerou uma interceção equivalente a -0,206 (95% CI -0,3918; 0,0056) e um declive igual a 1,091 (95% CI: 1,0341; 1,1407).

11.11 Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A Especificidade de Diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi avaliada em associação com o **ELITE InGenius** através da análise de amostras clínicas de sangue total colhidas em EDTA e plasma colhidas em EDTA, certificadas negativas ou presumivelmente negativas para o alvo. Dado que o **ELITE BeGenius** tem desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITE InGenius**, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a Especificidade de diagnóstico do ensaio obtido em associação com o ELITE InGenius também se aplica ao ELITE BeGenius.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 27 Especificidade do diagnóstico

Amostras	N	Positivo	Negativo	% de especificidade do diagnóstico
Sangue total colhido em EDTA e negativo para ADN de HSV2	125	0	125	100
Plasma colhido em EDTA e negativo para ADN de HSV2	92	0	92	100
Líquido cefalorraquidiano negativo para ADN de HSV2	67	0	67	100

O valor-limite de Ct do IC foi definido para 35 para amostras de sangue total colhidas em EDTA, plasma colhido em EDTA e amostras de LCR quando testadas com o ELITE InGenius e o ELITE BeGenius.

11.12 Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A Sensibilidade de Diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada em associação com o **ELITE InGenius** através da análise de amostras clínicas de sangue total colhido em EDTA, de plasma colhido em EDTA e LCR, certificadas positivas para o alvo ou reforçadas com material de referência. 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.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 28 Sensibilidade de diagnóstico

Amostras	N	Positivo	Negativo	% Sensibilidade de diagnóstico
Sangue total colhido em EDTA e reforçado para ADN de HSV2	53	53	0	100
Plasma colhido em EDTA e reforçado para ADN de HSV2	52	51	1	98
Líquido cefalorraquidiano positivo para ADN de HSV2	1	1	0	100
Líquido cefalorraquidiano reforçado para HSV2	55	55	0	

NOTE

Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e os instrumentos estão registados no Ficheiro técnico do produto para o "HSV2 ELITE MGB® Kit", FTP032PLD.

12 AMOSTRAS E CONTROLOS PARA O Instrumento ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR

12.1 Amostras

Os seguintes métodos de extração de amostras e ácidos nucleicos estão validados para a utilização com o HSV2 ELITe MGB Kit usando o Instrumento ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR.

Table 29

Tipo de amostra	Kit/método	Protocolo	Volume de entrada (µL)	Volume de eluição (µL)	Volume mínimo do tubo primário (µL)	Instruções especiais
Sangue total	ELITe GALAXY	xNA Extraction (Universal)	300	200	400-650	Adicione 10 µL/amostra de CPE à solução de CI + Portador

12.2 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.

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

12.3 Controlos de amplificação

É obrigatório validar cada sessão de amplificação com uma reação de Negative Control e uma reação de Positive Control.

Para o Negative Control, use água de qualidade para biologia molecular (não fornecida com este kit) adicionada à reação no lugar do ADN extraído a partir da amostra.

Para o Positive Control, use o produto **HSV2 - ELITePositive Control** ou o produto **HSV2 - ELITe Standard**.

12.4 Controlos da qualidade

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

13 PROCEDIMENTO do instrumento ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR

13.1 Definição da sessão de amplificação em tempo real

Antes de iniciar a sessão, consulte a documentação do instrumento para:

- ligar o instrumento, ligar o computador, abrir o software dedicado e abrir uma sessão de "quantificação absoluta" e defina o "Run mode: Fast 7500";
- definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda HSV2 com o "dispositivo de relatório" = "FAM" e o "inativador" = "nenhum" (não fluorescente) e identificá-lo como "HSV2";

- definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda de Internal Control com o "dispositivo de relatório" = "VIC" (AP525 é semelhante ao VIC) e o "inativador" = "nenhum" (não fluorescente) " e dar-lhe o nome "CI";
- para cada poço em utilização na microplaca, defina (Inspetor do poços) o "detetor" (fluorescência a ser medida), a "referência passiva" = "Cy5" (é usado AP593 em vez de Cy5, para normalização dos níveis de fluorescência) e o tipo de reação (amostra, negative control, positive control ou standard de quantidade conhecida).

NOTE

Para quantificar o ADN na amostra inicial, inclua uma série de reações usando **Q-PCR Standards** (10^5 cópias/rxn, 10^4 cópias/rxn, 10^3 cópias/rxn, 10^2 cópias/rxn) para obter a **curva de Standard**.

Veja a seguir, a título de exemplo, como pode configurar a análise quantitativa de 12 amostras.

S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
NC	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵							

Legenda: **S1 -S12:** Amostras a serem analisadas; **NC:** Negative Control da amplificação;

10²: 10^2 cópias de standard; **10³:** 10^3 cópias de standard; **10⁴:** 10^4 cópias de standard; **10⁵:** 10^5 cópias de standard.

Consulte a documentação do instrumento para configurar os parâmetros da **ciclagem térmica** (Instrumento > Protocolo do ciclador térmico > Perfil térmico):

- adicione **uma extensão de 20 segundos a 72°C** (passo de adição);

NOTE

Nota: A aquisição de fluorescência tem de ser configurada durante o passo de hibridização a 60°C (Instrumento > Protocolo do ciclador térmico > Definições > Recolha de dados).

- modifique as temperaturas e os tempos da ciclagem térmica como indicado na tabela "**Thermal cycle**" (Ciclo térmico);
- defina o número de ciclos para **45**
- defina o volume da amostra para **30 µL**
- opcional: adicione a fase de dissociação (Adicionar fase de dissociação) e defina a temperatura inicial para **40 °C** e a temperatura final para **80 °C**.

Table 30 Ciclo térmico

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

Table 30 Ciclo térmico (continued)

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

13.2 Preparação da sessão de PCR em tempo real

(executado pelo instrumento **ELITe GALAXY**)

Para realizar a configuração da sessão de PCR:

- descongele os tubos de **Q-PCR Mix** necessários para a sessão (cada tubo é suficiente para a preparação de **25 reações**)
- descongele os tubos de **Positive Control** (análise qualitativa: detecção de ADN extraído) ou de **Q - PCR Standard** (análise quantitativa: quantificação de ADN extraído)
- misture suavemente os reagentes centrifugue o conteúdo durante 5 segundos
- prepare o **Negative Control** (não fornecido) segundo as instruções de utilização do instrumento
- prepare uma **Q-PCR microplate**. Manuseie com luvas sem pó e não danifique os poços

NOTE

Para preparar a PCR no **ELITe GALAXY**, carregue a microplaca de eluição, contendo as amostras de ADN extraído, os reagentes e a **Q-PCR microplate**, conforme indicado no manual do utilizador do instrumento e siga os passos na GUI.

O instrumento executa automaticamente a configuração da PCR dispensando em cada poço da **Q-PCR microplate**:

- **20 µL** de **Q-PCR Mix**
- **20 µL** de **ADN extraído / Q-PCR Standard / controlos**

NOTE

Se não usar a totalidade de Q-PCR Mix, guarde o volume restante num local escuro a -20°C durante um período máximo de um mês. Congele e descongele a Q-PCR Mix até um máximo de **5 VEZES**.

Após a configuração da PCR realizada no instrumento:

- sele a **Q-PCR microplate** com um selante ótico
- transfira a **Q-PCR microplate** para o **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** e inicie a PCR. Guarde o ficheiro de execução com um nome único e reconhecível (por ex., "ano-mês-dia-TARGET-EGSpA").

NOTE

No final da PCR, a **Q-PCR microplate** deve ser eliminada seguindo todos os regulamentos governamentais e ambientais. Para evitar derramar os produtos de PCR, o **selante ótico não deve ser removido da microplaca de Q-PCR**.

13.3 Definições gerais para a análise dos resultados

Antes de iniciar a análise, consulte a documentação do instrumento para:

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

NOTE

A fluorescência FAM da sonda de HSV2 numa amostra com uma elevada concentração de ADN de HSV2 pode começar a aumentar antes do ciclo 15. Neste caso, diminua o intervalo de cálculo do **Valor basal** para o ciclo a que a fluorescência FAM da amostra começa a aumentar (Resultados > Componente).

- Defina manualmente os limites para os detetores

defina o **limite** "HSV2" do detetor FAM para **0,2**;

defina o **limite** do "CI" do detetor VIC para **0,1**.

O ciclo de PCR a que o nível de fluorescência da amostra atinge o valor do **limite** determina o **ciclo-limite (Ct)** para essa amostra.

O software do instrumento analisa automaticamente os níveis de fluorescência nos controlos, standards e reações da amostra e calcula os valores de Ct.

13.4 Análise qualitativa dos resultados

O valor de **Ct** de HSV2 do **Positive Control** é usado para validar a PCR. A execução da PCR é válida quando os resultados são os descritos na tabela seguinte:

Table 31

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

Se o resultado do **Positive Control** for **Ct > 25** ou **Ct Indeterminado** para o detetor FAM "HSV2", a sessão é inválida e tem de ser repetida a partir do passo da PCR. Isto pode indicar um problema durante a configuração da PCR, o passo de PCR ou deteção (por ex., distribuição incorreta ou degradação de Q-PCR Mix ou positive control, colocação incorreta do positive control, definições incorretas do ciclo térmico), o que pode levar a resultados incorretos.

NOTE

Quando o 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 10⁵ (Ct ≤ 25)**.

O valor de Ct de HSV2 do **Negative Control** é usado para validar a PCR. A execução da PCR é válida quando os resultados são os descritos na tabela seguinte:

Table 32

Detetor de reação de Negative Control FAM "HSV2"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct não determinado	NEGATIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação de **Negative control** for diferente de **Ct indeterminado** para o detetor FAM "HSV2", a sessão é inválida e deve ser repetida a partir do passo da PCR. Isto pode ser indicativo de problemas ocorridos durante o passo de amplificação (contaminação), que podem originar resultados incorretos e falsos positivos.

O valor de **Ct** de HSV2 em cada amostra é usado para detetar o ADN do alvo e o valor de **Ct** do controlo interno é usado para validar a extração, PCR e deteção.

NOTE

Verifique com o traçado da amplificação (Resultados > Traçado de amplificação > delta Rn vs. Ciclo) que o **Ct** de cada amostra foi determinado por um aumento rápido e regular da fluorescência e não por picos ou um aumento do sinal de fundo (fundo irregular ou alto).

Os possíveis resultados da amostra (Resultados > Relatório) são descritos na tabela seguinte:

Table 33

Reação da amostra		Adequação da amostra	Resultado da amostra 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

Um resultado da amostra de **Ct indeterminado** para HSV2 e **Ct > 35** ou **Ct indeterminado** para o controlo interno é inválido e indica um problema durante a extração de ácido nucleico ou PCR (por ex., degradação do ADN da amostra, perda de ADN durante a extração, presença de inibidores no ADN, amplificação ineficaz ou ausente), o que pode originar resultados incorretos. A amostra não é adequada para análise e o ensaio tem de ser repetido a partir da extração de uma nova amostra.

Um resultado da amostra de **Ct indeterminado** para HSV2 e **Ct ≤ 35** para o controlo interno é um resultado válido e indica que não foi detetado ADN de HSV2 na amostra. A amostra pode conter ADN de HSV2 ou conter ADN de HSV2 a uma concentração inferior ao limite de deteção do produto (ver [14 Características de desempenho page 40](#)). Um resultado da amostra de **Ct determinado (Ct ≤ 45)** para HSV2 e **Ct > 35**, **Ct indeterminado** ou **Ct ≤ 35** para IC é um resultado válido e indica que foi detetado ADN de HSV2 na amostra

NOTE

Em caso de Ct determinado para HSV2 e Ct > 35 ou indeterminado para IC, a eficácia da PCR do IC pode ter sido afetada pela concorrência com a eficácia da PCR do ADN de HSV2 alta. Neste caso, a amostra é adequada e o resultado positivo é válido.

NOTE

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

13.5 Análise quantitativa dos resultados

Nas reações de amplificação de 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 deteção como descrito na tabela seguinte:

Table 34

Detetor da curva standard FAM "HSV2"	Intervalo de aceitação	Amplificação/deteção
Coefficiente de correlação (R2)	$0,990 \leq R2 \leq 1,000$	CORRETO

Se o valor do **coeficiente de correlação (R²)** não se enquadrar dentro dos limites, a sessão é inválida e tem de ser repetida a partir do passo da PCR. Isto pode indicar um problema durante o passo de PCR ou deteção (por ex., distribuição incorreta ou degradação de Q-PCR Mix ou standards, colocação incorreta dos standards, definições incorretas do ciclo térmico ou contaminação cruzada), o que pode levar a resultados incorretos.

Table 35

Resultado da amostra para o detetor FAM "HSV2"	Cópias HSV2 por reação
Quantidade > 1 x 10 ⁶	MAIS DE 1 x 10 ⁶
1 x 10 ¹ ≤ Quantidade ≤ 1 x 10 ⁶	= Quantidade
Quantidade < 1 x 10 ¹	MENOS DE 10

Os resultados (**Quantidade**) de cada amostra (Resultados > Relatório) são usados para calcular as cópias de HSV2 presente na amostra usada na extração (**Nc**) de acordo com esta fórmula:

Table 36

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

em que:

Ve é o volume total em **µL** da amostra de ADN extraído (volume de eluato)

Quantidade é **cópias/reação** da amostra calculada pelo software do instrumento (resultado da PCR)

Vc é o volume da amostra usado para a extração do ácido nucleico (volume de introdução) expresso na unidade de medida requerida

Va é o volume em **µL** da amostra de ADN extraído (eluato) usado na PCR

Ep é a eficácia do procedimento (extração e PCR) **expressa em decimais**

Para converter a quantidade de amostra de cópias/mL para IU/mL, multiplique o valor de cópias/mL pelo **fator de conversão (Fc)**. O Fc foi calculado usando material de referência certificado calibrado (1st WHO International Standard for HSV2 DNA, NIBSC ref.17/122, Reino Unido) (ver [14 Características de desempenho page 40](#)).

Por motivos de comodidade, as seguintes fórmulas são fórmulas simplificadas onde foi calculado $Ve/(Vc \times Va \times Ep)$ e a sua conversão em IU/mL.

Table 37

Matriz	Método de extração de ácido nucleico	Ve/ (Vc x Va x Ep)	Fórmula a quantificar Nc (cópias/mL)	Fc (IU/cópia)	Fórmula a quantificar Nc (IU/mL)
Sangue total	ELITE GALAXY	35	35 x quantidade	0,2	7 x quantidade

14 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O Instrumento ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR

14.1 Limite de detecção (LdD)

O limite de detecção (LdD) do ensaio em associação com o sangue total foi verificado nos instrumentos ELITE GALAXY e ABI 7500, através da análise de um painel de matrizes negativas de HSV2 reforçadas com material de referência certificado (QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel's sample HSV08-12). Foi executada a análise de regressão Probit nos resultados, e estimou-se como LdD a concentração correspondente a 95% de probabilidade de um resultado positivo.

Table 38 Limite de detecção com o ELITE GALAXY (IU/mL)

Matriz	95% de positividade	intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
sangue total	34	22	101

O LdD como cópias/mL para cada matriz é calculada através da aplicação do fator de conversão específico reportado no parágrafo [14.6 Conversão para unidades internacionais page 41](#).

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

Table 39 Limite de detecção com o ELITE GALAXY (cópias/mL)

Matriz	95% de positividade	intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
sangue total	171	112	505

14.2 Intervalo de medição linear

O intervalo de medição linear do ensaio foi determinado em associação com sangue inteiro no **ELITE GALAXY** e **ABI 7500** usando um painel de diluição de ADN do plasmídeo contendo o produto de amplificação.

O intervalo de medição linear como cópias/mL é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado no parágrafo [14.6 Conversão para unidades internacionais page 41](#)

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Table 40 Intervalo de medição linear para amostras de sangue total

Unidade de medida	limite inferior	limite superior
IU/mL	2	200.000
cópias/reação	10	1.000.000

14.3 Inclusividade: Eficiência de detecção e eficiência de quantificação em diferentes genótipos

A inclusividade do ensaio, como eficiência de detecção de diferentes genótipos de *Herpes Simplex Virus Type 2* foi avaliada por análise *in silico* das sequências disponíveis nas bases de dados de nucleótidos. A análise revelou a conservação da sequência e a ausência de mutações significativas. Assim, espera-se uma detecção eficiente para as diferentes estirpes ou isolados.

14.4 Marcadores potencialmente interferentes: Reatividade cruzada

A potencial reatividade cruzada de organismos não pretendidos que podem ser encontrados em amostras clínicas foi avaliada através de análise *in silico*. A análise não demonstrou homologias significativas com outros organismos não pretendidos (vírus, bactérias, protozoários e fungos). Por conseguinte, não é esperada qualquer reatividade cruzada.

14.5 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do ensaio foi avaliada no ABI 7500 por análise de um painel de amostras reforçado com ADN do plasmídeo contendo o produto da amplificação de HSV2 e Internal Control em diferentes concentrações.

Um resumo de reprodutibilidade interlote (em dez lotes do HSV2 ELITE MGB Kit) é mostrado na tabela seguinte:

Table 41 Reprodutibilidade interlote no ABI 7500

Amostra cópias/ /reação	N	Ct média HSV2	Ct média IC	SD HSV2	SD IC	%CV HSV2	%CV IC	Result- tado
100.000 alvo	30	23,19	-	0,64	-	2,76	-	Passou
50.000 alvo + 150.000 IC	30	24,00	22,26	0,56	0,40	2,34	1,79	Passou
5.000 alvo + 150.000 IC	30	27,44	22,59	0,58	0,37	2,12	1,63	Passou
500 alvo + 150.000 IC	30	30,76	22,56	0,71	0,37	2,30	1,62	Passou
10 alvo + 150.000 IC	90	36,71	22,61	0,99	0,38	2,70	1,70	Passou
150.000 IC	30	-	22,49	-	0,40	-	1,77	Passou
6.000 IC	90	-	27,99	-	0,51	-	1,83	Passou

No teste de reprodutibilidade, o HSV2 ELITE MGB Kit detetou todas as amostras conforme esperado e apresentou uma variabilidade máxima dos valores de Ct do alvo como %CV menor que 5%.

14.6 Conversão para unidades internacionais

O fator de conversão para relatar os resultados quantitativos em unidades internacionais / mL começando por cópias / mL, foi calculado, para sangue total colhido em EDTA, usando o material de referência calibrado e certificado (1st WHO International Standard for HSV2 DNA, NIBSC ref.17/122, Reino Unido).

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 42 Fator de conversão para unidades internacionais com ABI 7500 e sangue total

Instrumento	Fc (IU/cópias)
ELITE GALAXY	0,2

14.7 Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade do diagnóstico do ensaio, bem como a confirmação de amostras clínicas negativas foi avaliada analisando em associação com o **ELITE GALAXY** e o Instrumento ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR amostras certificadas negativas para o alvo.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 43 Especificidade do diagnóstico

Amostras	N	positivo	negativo	% de especificidade do diagnóstico
Sangue total colhido em EDTA e negativo para ADN de HSV2	57	0	57	100

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

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

A análise das regiões escolhidas para a hibridização dos primers e da sonda fluorescente no alinhamento das sequências disponíveis na base de dados para o gene gpD do HSV2 revelou a respetiva conservação e ausência de mutações significativas.

14.9 Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade do diagnóstico do ensaio, bem como a confirmação de amostras clínicas positivas foi avaliada analisando em associação com o **ELITE GALAXY** e o ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument amostras reforçadas com material de referência de HSV2.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte

Table 44

Amostras	N	positivo	negativo	% Sensibilidade de diagnóstico
Sangue total colhido em EDTA e reforçado para ADN de HSV2	54	54	0	100

NOTE

Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e os instrumentos estão registados no Ficheiro técnico do produto "HSV2 ELITE MGB Kit", FTP032PLD.

15 REFERÊNCIAS

E. T. E. Fenner et al. (1991) J Clin Microbiology 29: 2621 - 2622

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

16 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Utilize apenas este produto com as seguintes amostras clínicas: sangue total colhido em EDTA (todos os instrumentos), plasma colhido em EDTA e LCR (ELITE InGenius e ELITE BeGenius).

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 a uma inibição causada por fármacos antivirais, antibióticos, quimioterapêuticos ou imunossuppressores.

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

Devido à sua elevada sensibilidade analítica, o método de PCR em tempo real usado neste produto é sensível a contaminação a partir de amostras clínicas positivas, dos controlos positivos e dos produtos de PCR. A contaminação cruzada causa resultados falsos positivos. O formato do produto foi concebido para limitar a contaminação cruzada. No entanto, as contaminações cruzadas podem ser evitadas simplesmente através de boas práticas laboratoriais e do cumprimento destas instruções de utilização

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

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

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

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 indica que o ADN do alvo não foi detetado no ADN extraído da amostra; no entanto, não pode negligenciar-se o facto de o ADN do alvo ter um título mais baixo que o limite de deteção do produto (ver [11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITe InGenius e ELITe BeGenius page 24](#)). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

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

Possíveis polimorfismos, inserções ou deleções na região do ADN do alvo abrangida pelos primers do produto e pelas sondas podem prejudicar a deteção e quantificação do ADN alvo.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, os resultados obtidos com este produto têm de ser interpretados em combinação com todas as observações clínicas e resultados laboratoriais relevantes.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, existe um risco residual de obter resultados inválidos ou errados com este produto. Este risco residual não pode ser eliminado ou ainda mais reduzido. Nalguns casos, este risco residual pode contribuir para decisões erradas com potenciais efeitos perigosos para o doente. No entanto, este risco residual associado à utilização prevista do produto foi ponderado em relação aos potenciais benefícios para o paciente e foi considerado aceitável.

17 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

ELITe InGenius e ELITE BeGenius

Table 45

Reação do Q-PCR Standard, curva standard ou reação do Controlo Positivo inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da Q-PCR Mix, dos Q-PCR Standards e do Positive Control. Verifique os volumes da Q-PCR Mix, dos Q-PCR Standards e do Positive Control.
Degradação da PCR Mix.	Não use a Q-PCR Mix durante mais de 5 sessões independentes (3 horas cada no bloco de refrigeração da Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit). Não utilize a Q-PCR Mix durante mais de 3 sessões consecutivas (7 horas no bloco de refrigeração da Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit). Não deixe a Q-PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos. Utilize uma nova alíquota de Q-PCR Mix.
Degradação dos Q-PCR Standards ou do Positive Control.	Não use o Q-PCR Standard para mais de 4 sessões independentes (2 horas cada na área de extração ou na Cooler Unit). Não use o Positive Control para mais de 4 sessões independentes (3 horas cada na área de extração ou na Cooler Unit). Use novas alíquotas dos Q-PCR Standards ou do Positive Control.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 46

Reação de Negative Control inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da Q-PCR Mix e do Negative Control. Verifique os volumes da Q-PCR Mix e do Negative Control.
Contaminação do Negative Control.	Não use o Negative Control para mais do que 1 sessão. Utilize uma nova alíquota de água de grau de biologia molecular.
Contaminação da PCR Mix.	Utilize uma nova alíquota de Q-PCR Mix.
Contaminação da área de extração, dos Racks, do Inventory Block (Gestor do reagente) ou da Cooler Unit.	Limpe as superfícies com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos e as pontas utilizadas.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 47

Reação da amostra inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da Q-PCR Mix, do Controlo Interno e da amostra. Verifique os volumes da Q-PCR Mix do Controlo Interno e da amostra.
Degradação da PCR Mix.	<p>Não use a Q-PCR Mix durante mais de 5 sessões independentes (3 horas cada na Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit).</p> <p>Não utilize a Q-PCR Mix durante mais de 3 sessões consecutivas (7 horas no bloco de refrigeração da Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit).</p> <p>Não deixe a Q-PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos.</p> <p>Utilize uma nova alíquota de Q-PCR Mix.</p>
Degradação do modelo do Controlo Interno.	Utilize uma nova alíquota de Controlo Interno.
Inibição devido a substâncias interferentes na amostra.	<p>Repita a amplificação de amostra eluída com uma diluição 1:2 em água de grau de biologia molecular numa sessão "PCR Only" (apenas PCR).</p> <p>Repita a extração da amostra com uma diluição 1:2 em água de qualidade para biologia molecular numa sessão "Extract + PCR" (Extract + PCR).</p>
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 48

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

Table 49

Erro no cálculo de Ct	
Causas possíveis	Soluções
Concentração demasiado alta do alvo na amostra ou amostra com sinal de fluorescência anómalo.	<p>Se for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR, selecione o rastreio relacionado com a amostra e aprove manualmente o resultado como sendo positivo.</p> <p>Se não for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR, selecione o rastreio relacionado com a amostra e aprove manualmente o resultado como sendo negativo, ou deixe-o como inválido.</p> <p>Se for necessário um valor de Ct:</p> <ul style="list-style-type: none"> - repita a amplificação de amostra eluída com uma diluição 1:10 em água de grau de biologia molecular numa sessão "PCR Only" (Apenas PCR) - repita a extração da amostra com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular numa sessão "Extract + PCR" (Extract + PCR).

Table 50

Elevada taxa anómala de resultados positivos na mesma sessão (reações com valores de Ct recentes semelhantes)	
Causas possíveis	Soluções
Contaminação entre amostras durante os passos pré-analíticos.	<p>Limpe a micropipeta com uma solução de hipoclorito de sódio (lixívia) a 3% nova ou detergente de ADN/ARN após usar a pipeta em cada amostra.</p> <p>Não use pipetas Pasteur. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis.</p> <p>Introduza as amostras nas últimas posições dos instrumentos, tal como indicado nas GUI. Siga a sequência de carregamento indicada pelo software.</p>
Contaminação pelo ambiente laboratorial.	<p>Limpe todas as superfícies em contacto com o operador e as amostras (incluindo as pipetas) com uma solução de hipoclorito de sódio a 3% (lixívia) nova ou produto de limpeza de ADN/ARN.</p> <p>Realize um ciclo de descontaminação U.V.</p> <p>Utilize um novo tubo de Q-PCR Mix e/ou Controlo Interno</p>

Plataforma aberta**Table 51**

Reação do Q-PCR Standard, curva standard ou reação do Controlo Positivo inválida	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	Verifique os volumes da Mistura PCR, dos Q-PCR Standards e do Positive Control dispensados na microplaca Q-PCR.
Degradação da Q-PCR Mix.	<p>Não congele e descongele a PCR mix mais de 5 vezes.</p> <p>Não deixe a Q-PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos.</p> <p>Utilize uma nova alíquota de Q-PCR Mix.</p>
Degradação dos Q-PCR Standards ou do Positive Control.	<p>Não congele e descongele o standard de Q-PCR mais de 4 vezes.</p> <p>Use novas alíquotas dos Q-PCR Standards ou do Positive Control.</p>
Erro na configuração do instrumento.	<p>Verifique a posição da PCR Mix, dos Q-PCR Standards e do Positive Control no instrumento.</p> <p>Verifique as definições do ciclo térmico no instrumento.</p>

Table 52

Reação de Negative Control inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da Q-PCR Mix e do Negative Control. Verifique os volumes da Q-PCR Mix e do Negative Control.
Microplaca mal vedada.	Proceda com cuidado ao selar a microplaca de Q-PCR com um selante ótico.
Contaminação do Negative Control.	Não use o Negative Control para mais do que 1 sessão. Utilize uma nova alíquota de água de grau de biologia molecular.

Table 52 (continued)

Reação de Negative Control inválida	
Causas possíveis	Soluções
Contaminação da PCR Mix.	Utilize uma nova alíquota de Q-PCR Mix.
Contaminação da área de preparação, racks e micropipeta.	Limpe as superfícies e instrumentos com detergentes aquosos, lave as batatas de laboratório, substitua os tubos de ensaio e as pontas em utilização.

Table 53

Reação da amostra inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da Q-PCR Mix, do Controlo Interno e da amostra. Verifique os volumes da Q-PCR Mix do Controlo Interno e da amostra.
Degradação da PCR Mix.	Não congele e descongele a PCR mix mais de cinco vezes. Não deixe a Q-PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos. Utilize uma nova alíquota de Q-PCR Mix
Degradação do modelo do Controlo Interno.	Utilize uma nova alíquota de Controlo Interno.
Inibição devido a substâncias interferentes na amostra.	Repita a amplificação de amostra eluída com uma diluição 1:2 em água de grau de biologia molecular. Repita a extração da amostra com uma diluição 1:2 em água de qualidade para biologia molecular.

Table 54

Fluorescência de fundo irregular ou elevada nas reações	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta da amostra.	Verifique os volumes de reagentes e amostras dispensados na microplaca de Q-PCR.
Erro na configuração da linha de base.	Se o intervalo do cálculo para o valor basal definido desde o ciclo 6 ao ciclo 15 não for adequado para a normalização do fundo, defina o intervalo de cálculo nos ciclos para o ponto onde a fluorescência do fundo já tenha estabilizado (verifique Resultados > Componente) e a fluorescência do alvo ainda não tenha começado a aumentar.

Table 55

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

18 SÍMBOLOS



Número de catálogo.



Limite máximo da temperatura.



Código de lote.



Prazo de validade (último dia do mês).



Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*.



Cumprimento dos requisitos dos Regulamentos IVDR 2017/746/CE relativo a dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*. Certificação emitida pela TÜV Süd Product Service GmbH, Alemanha.



Identificação única do dispositivo



Contém suficiente para "N" testes.



Consultar as instruções de utilização.



Conteúdo.



Manter afastado da luz solar.



Fabricante.

19 NOTIFICAÇÃO PARA OS UTILIZADORES

Qualquer incidente grave ocorrido relacionado com o dispositivo deve ser comunicado ao fabricante e às autoridades competentes do Estado-Membro em que o utilizador e/ou o doente se encontram localizados. No momento da revisão atual das IDU, não ocorreu nenhum incidente grave ou recolha de segurança com impacto no desempenho do produto e na segurança do dispositivo.

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

20 NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA

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

Os reagentes de deteção ELITe MGB® são abrangidos por um ou mais dos números de patente dos EUA 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529 e números de patente EP 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 bem como pedidos que estejam atualmente pendentes.

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

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

Appendix A HSV2 ELITE MGB Kit usado em associação com as plataformas Genius series®



CAUTION

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

Utilização prevista

O produto **HSV2 ELITE MGB® Kit** consiste num dispositivo médico de diagnóstico *in vitro* que se destina a ser usado por profissionais de saúde como um ensaio quantitativo de PCR em tempo real de ácidos nucleicos para a **deteção e a quantificação do ADN do vírus Herpes Simplex tipo 2 (HSV2)** extraído de amostras clínicas.

O ensaio foi validado em associação com os instrumentos **ELITE InGenius®** e **ELITE BeGenius®**, sistemas automatizados e integrados para a extração, a PCR em tempo real e a interpretação dos resultados, usando amostras de sangue total colhido em EDTA, e plasma colhido em EDTA e líquido cefalorraquidiano (LCR).

O ensaio está também validado em associação com o **ELITE GALAXY**, sistema automático de extração e configuração de PCR e o **instrumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR**, plataforma de PCR em tempo real, usando amostras humanas de sangue total colhido em EDTA.

O produto destina-se a ser utilizado como um auxílio no diagnóstico monitorização de infeções por HSV2 em pacientes com suspeita de infeção ou sujeitos a monitorização de infeção por HSV2.

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


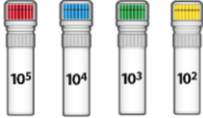

Sequência amplificada

Sequência	Gene	Fluoróforo	Canal
Alvo	Glicoproteína G (gpG)	FAM	HSV2
Internal Control	Gene beta globina humana	AP525	IC

Matriz validada

- Sangue total colhido em EDTA
- Plasma colhido em EDTA
- LCR

Conteúdo do Kit e produtos relacionados

HSV2 ELITE MGB Kit	HSV2 ELITE Standard	HSV2 - ELITE Positive Control
 X 4	 X 2	 X 2
PCR Mix pronta a utilizar 4 tubos de 540 µL 96 reações por kit 5 ciclos de congelação-descongelação	Pronta a utilizar, 4 níveis: 10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² 2 conjuntos de 4 tubos de 200 µL 4 ciclos de congelação-descongelação	Ready-to-use PC 2 tubos de 160 µL 8 reações por kit 4 ciclos de congelação-descongelação

Prazo de conservação máximo: **24 meses**

Temperatura de armazenamento:
-20 °C

Outros produtos necessários não fornecidos no kit

<ul style="list-style-type: none"> Instrumento ELITE InGenius: INT030. Instrumento ELITE BeGenius: INT040. ELITE InGenius SP 200: INT032SP200. ELITE InGenius SP1000: INT033SP1000 ELITE InGenius SP 200 Consumable Set: INT032CS. 	<ul style="list-style-type: none"> ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR. ELITE InGenius Waste Box: F2102-000. CPE - Internal Control: CTRCPE Pontas de filtro Axigen de 300 µL: TF-350-L-R-S. Pontas de filtro Tecan de 1000 µL: 30180118.
---	---

Protocolo do ELITE InGenius e do ELITE BeGenius

<ul style="list-style-type: none"> › Volume da amostra › Volume CPE › Volume de eluição total 	200 µL (InGenius e BeGenius) ou 1000 µL (apenas InGenius) 10 µL 100 µL	<ul style="list-style-type: none"> › Volume de entrada de PCR eluato › Q—PCR Mix volume › Frequência dos controlos 	20 µL 20 µL 15 dias
--	--	---	---------------------------

Desempenhos ELITE InGenius e ELITE BeGenius

Matriz	Limite de deteção		Sensibilidade de diagnóstico	Especificidade do diagnóstico
	IU/mL	cópias/mL		
sangue total	33	165	100	100
Plasma	12	119	98	100
LCR	24	119	100	100

Preparação da amostra

Este produto destina-se a ser usado no instrumento **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** com o ácido nucleico extraído das seguintes amostras clínicas identificadas de acordo com as diretrizes laboratoriais, e colhidas, transportadas e armazenadas sob as condições seguintes.

Tipo de amostra	Requisitos de colheita	Condições de transporte/armazenamento			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2 / +8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Sangue total	EDTA	≤ 1 d	≤ 3d	≤ 30 d	≤ 30 d
Plasma	EDTA	≤ 1 d	≤ 3d	≤ 30 d	≤ 30 d
LCR	-	≤ 4 horas	≤ 4 horas	≤ 30 d	≤ 30 d

C EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; d, dia.

Procedimentos ELITe InGenius

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

Antes da análise

<p>1. Ligue o ELITe InGenius. Inicie sessão com o nome de utilizador e a palavra-passe. Selecione o modo "CLOSED" (Fechado).</p>	<p>2. Verifique os controlos: Positive Control e Negative Control no menu "Controls" (Controlos). Nota: Ambos devem ter sido executados, aprovados e não ter expirado.</p>	<p>3. Descongele a PCR Mix e os tubos de CTRCPE. Submeta a vórtice suave. Centrifugue durante 5 s.</p>
--	---	---

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

<p>1. Selecione "Perform Run" (Executar) no ecrã tátil</p>	<p>2. Verifique os volumes de extração: Entrada: "200 µL", eluição: "100 µL"</p>	<p>3. Leia os códigos de barras das amostras com um leitor de códigos de barras manual ou escreva a identificação da amostra</p>
<p>4. Selecione o "Assay protocol" (Protocolo de ensaio) de interesse: HSV2 ELITe_WB_200_100 ou HSV2 ELITe_PL_200_100 ou HSV2 ELITe_CSF_200_100</p>	<p>5. Selecione o método "Extract + PCR" (Extrair+PCR) e a posição da amostra: Tubo primário ou tubo de extração</p>	<p>6. Carregue a PCR Mix e o Internal Control no Inventory Block (Gestor do reagente)</p>
<p>7. Carregar: PCR Cassette, cartucho de extração, tubo de eluição, pontas, racks do tubo de extração e racks de amostra primária</p>	<p>8. Feche a porta. Iniciar a execução</p>	<p>9. Visualize, aprove e guarde os resultados</p>

NOTE

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

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

1. Selecione “Perform Run” (Executar) no ecrã tátil	2. Verifique os volumes de extração: Entrada: “200 µL”, eluição: “100 µL”	3. Leia os códigos de barras das amostras com um leitor de códigos de barras manual ou escreva a identificação da amostra
4. Selecione o “Assay protocol” (Protocolo de ensaio) de interesse: HSV2 ELITe_PC e HSV2 ELITe_NC ou HSV2 ELITe_STD ou HSV2 ELITe_WB_200_100 ou HSV2 ELITe_PL_200_100 ou HSV2 ELITe_CSF_200_100	5. Selecione o método “PCR Only” (Apenas PCR) e a posição da amostra “Elution Tube” (Tubo de eluição)	6. Carregue a PCR Mix no Inventory Block (Gestor do reagente)
7. Carregar: Rack de PCR Cassette e suporte de Elution tube (Tubo de eluição) com o ácido nucleico extraído	8. Feche a porta. Iniciar a execução	9. Visualize, aprove e guarde os resultados

Procedimentos ELITe BeGenius

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

Antes da análise

1. Ligue o ELITe InGenius. Inicie sessão com o nome de utilizador e a palavra-passe. Selecione o modo “ CLOSED ” (Fechado).	2. Verifique os controlos: Positive Control e Negative Control no menu “Controls” (Controlos). Nota: Ambos devem ter sido executados, aprovados e não ter expirado.	3. Descongele a PCR Mix e os tubos de CTRCPE . Submeta a vórtice suave. Centrifugue durante 5 s.
--	--	--

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

1. Selecione “Perform Run” (Executar) no ecrã tátil e, a seguir, clique no modo de execução “Extract + PCR” (Extrair +PCR)	2. Insira o rack de amostras com as amostras com código de barras na Cooler Unit. A leitura do código de barras já se encontra ativada	3. Verifique os volumes de extração: Entrada: “200 µL”, eluato: “100 µL”
4. Selecione o “Assay protocol” (Protocolo de ensaio) de interesse HSV2 ELITe_Be_WB_200_100 ou HSV2 ELITe_Be_PL_200_100 ou HSV2 ELITe_Be_CSF_200_100 Nota: Se for realizada uma segunda extração, repita os passos 2 a 4	5. Imprima as etiquetas para colocar um código de barras nos tubos de eluição vazios. Carregue os tubos no rack de eluição e insira-o na Cooler Unit	6. Carregue a PCR Mix e o Internal Control no rack de reagente/eluição e insira-o na Cooler Unit
7. Carregue o “PCR Rack” (Rack de PCR) com “PCR Cassette” e o “Extraction Rack” (Rack de extração) com os cartuchos de extração “ELITe InGenius SP 200” e os consumíveis de extração necessários	8. Feche a porta. Iniciar a execução	9. Visualize, aprove e guarde os resultados

NOTE

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

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

1. Selecione “Perform Run” (Executar) no ecrã tátil	2. Verifique os volumes de extração: Entrada: “200 µL”, eluição: “100 µL”	3. Leia os códigos de barras das amostras com um leitor de códigos de barras manual ou escreva a identificação da amostra
4. Selecione o “Assay protocol” (Protocolo de ensaio) de interesse: HSV2 ELITE_PC e HSV2 ELITE_NC ou HSV2 ELITE_STD ou HSV2 ELITE_Be_WB_200_100 ou HSV2 ELITE_Be_PL_200_100 ou HSV2 ELITE_Be_CSF_200_100	5. Selecione o método “PCR Only” (Apenas PCR) e a posição da amostra “Elution Tube” (Tubo de eluição)	6. Carregue a PCR Mix no Inventory Block (Gestor do reagente)
7. Carregar: Rack de PCR Cassette e suporte de tubos de eluição com o ácido nucleico extraído	8. Feche a porta. Iniciar a execução	9. Visualize, aprove e guarde os resultados

Appendix B HSV2 ELITe MGB Kit usado em associação com o Instrumento ABI 7500



CAUTION

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

Utilização prevista

O produto **HSV2 ELITe MGB® Kit** consiste num dispositivo médico de diagnóstico *in vitro* que se destina a ser usado por profissionais de saúde como um ensaio quantitativo de PCR em tempo real de ácidos nucleicos para a **deteção e a quantificação do ADN do vírus Herpes Simplex tipo 2 (HSV2)** extraído de amostras clínicas.

O ensaio foi validado em associação com os instrumentos **ELITe InGenius®** e **ELITe BeGenius®**, sistemas automatizados e integrados para a extração, a PCR em tempo real e a interpretação dos resultados, usando amostras de sangue total colhido em EDTA, e plasma colhido em EDTA e líquido cefalorraquidiano (LCR).

O ensaio está também validado em associação com o **ELITe GALAXY**, sistema automático de extração e configuração de PCR e o **instrumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR**, plataforma de PCR em tempo real, usando amostras humanas de sangue total colhido em EDTA.

O produto destina-se a ser utilizado como um auxílio no diagnóstico monitorização de infeções por HSV2 em pacientes com suspeita de infeção ou sujeitos a monitorização de infeção por HSV2.

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


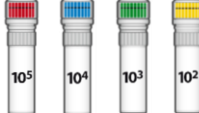

Sequência amplificada

Sequência	Gene	Fluoróforo	Canal
Alvo	Glicoproteína G (gpG)	FAM	HSV2
Internal Control	Gene beta globina humana	AP525	IC

Matriz validada

- Sangue total colhido em EDTA

Conteúdo do Kit e produtos relacionados

HSV2 ELITe MGB Kit	HSV2 ELITe Standard	HSV2 - ELITe Positive Control
 X 4	 X 2	 X 2
PCR Mix pronta a utilizar 4 tubos de 540 µL 96 reações por kit 5 ciclos de congelação-descongelação	Pronta a utilizar, 4 níveis: 10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² 2 conjuntos de 4 tubos de 200 µL 8 ciclos de congelação-descongelação	Ready-to-use PC 2 tubos de 160 µL 8 reações por kit 8 ciclos de congelação-descongelação

Prazo de conservação máximo: **24 meses**

Temperatura de armazenamento:
-20 °C

Outros produtos necessários não fornecidos no kit

<ul style="list-style-type: none"> • ELITe GALAXY INT020 • ELITe GALAXY 300 extraction kit: INT021EX • ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument 	<ul style="list-style-type: none"> • CPE - Internal Control: CTCPE • Água de qualidade para biologia molecular
---	--

Desempenhos do 7500 Real-Time PCR Instrument

Matriz	Limite de detecção	Especificidade do diagnóstico	Sensibilidade de diagnóstico	Linearidade (IU/mL)	Fórmula a quantitar (cópias/mL)	Fator de conversão cópias/mL a IU/mL
sangue total	171	100	100	2,0 - 2,0 x 10 ⁵	35 x quantidade	0,2

Procedimentos 7500 Real-Time PCR Instrument

O procedimento abaixo resume os principais passos da análise da amostra com o fluxo de trabalho de PCR convencional: sistemas de extração validados, definições do instrumento de PCR, configuração da PCR e interpretação dos resultados.

Extração - sistemas validados

Extração	Matriz validada	Volume da amostra processado	Volume de amostra mínimo	Volume total de eluato	Volume de controlo interno de CPE
ELITe Galaxy	WB	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL

Amplificação - definições do 7500 Fast Dx

1. Ligue o termociclador
2. Defina o detetor "HSV2" para "FAM" e o inativador para "none" (nenhum)
3. Defina o detetor "Internal Control" (Controlo Interno) para "VIC" e o inativador para "none" (nenhum)
4. Defina a fluorescência passiva como "Cy5"
5. Configure o perfil térmico conforme indicado. A aquisição e fluorescência deve ser definida durante o passo de hibridização a 60°C.

Fase	Temperatura	Tempo
Descontaminação	50°C	2 min
Desnaturação inicial	94°C	2 min
Amplificação Detecção 45 ciclos	94°C	10 seg
	60°C	30 seg
	72°C	20 seg

A análise da curva de fusão é opcional, consulte as instruções de utilização completas

Amplificação - Configuração da PCR (executada no ELITe GALAXY)

Para realizar a configuração da sessão de PCR:

1. descongele a Q PCR-Mix e os tubos de Positive Control / Q-PCR standard
2. misture suavemente e centrifugue
3. prepare o **Negative Control** (não fornecido)
4. prepare uma **Q-PCR microplate**
5. o instrumento executa automaticamente a configuração da PCR dispensando em cada poço da **Q-PCR microplate 20 µL** de **PCR Mix** e **20 µL** de **ADN extraído / Q-PCR Standard / Controlos**.

Após a configuração da PCR realizada no instrumento:

1. sele a **microplaca de Q-PCR com** um selante ótico
2. transfira a **Q-PCR microplate para o 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** e inicie a PCR. Guarde o ficheiro de execução com um nome único e reconhecível (por ex., "ano-mês-dia-TARGET-EGSpA").

Amplificação - limite para a análise qualitativa

Instrumento	HSV2 FAM	VIC de Internal Control
7500 Fast Dx Real Time PCR	0,2	0,1

Interpretação

Resultados qualitativos		
Valor de Ct do HSV2	Valor de Ct do Internal Control	Interpretação
Determinado	—	Positivo
Indeterminado	Ct ≤ 35	Negativo
	Ct >35 ou indeterminado	Inválido*

* Repita o ensaio a partir da extração

Resultados quantitativos
O valor de Ct de HSV2 obtido para cada amostra e curva de standard gerado é usado para calcular a quantidade de ADN do alvo na reação
A quantificação da amostra vai de cerca de 10 a 10 ⁶ cópias/reação.

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

