

Instructions for use

HHV7 ELITe MGB® Kit

reagentes para PCR em tempo real do ADN



REF RTS037PLD

UDI 08033891484590



HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES

Rev.	Aviso de alteração	Data (dd/ /mm/aa)
07	Novo parágrafo: "11.4: Incerteza da curva de standard" Atualização dos parágrafos: "Outro produto necessário", "Materiais necessários mas não fornecidos", "8.1: Amostras", "Símbolos" e "Nota para o adquirente" Novos gráficos e definição de conteúdos das instruções de utilização.	31/10/25
06	Atualização das CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO: Valores de LdD, LIdD e LSdD confirmados na matriz; Repetibilidade e Reprodutibilidade calculadas na matriz; Valor de corte interno alterado de 36 para 35	23/01/24
05	Atualização do parágrafo CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO para a definição do valor-limite de HHV7 Ct igual a 35 para a matriz de sangue total	24/02/22
04	Ao utilizar o instrumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR é agora necessário definir manualmente o limite do detetor FAM "HHV7" para 0,2.	05/10/17
00 — 03	desenvolvimento de novo produto e alterações subsequentes	-

NOTE

A revisão destas instruções de utilização também é compatível com a versão anterior do kit

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 ELITe InGenius and ELITe BeGenius	8
9 PROCEDIMENTO do ELITe InGenius	11
10 PROCEDIMENTO do ELITe BeGenius	18
11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM ELITe InGenius e ELITe BeGenius	24
12 AMOSTRAS E CONTROLOS PARA OUTROS SISTEMAS	30
13 PROCEDIMENTO NOUTROS SISTEMAS	32
14 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM OUTROS SISTEMAS	41
15 REFERÊNCIAS	44
16 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	44
17 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	45
18 SÍMBOLOS	49
19 NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	50
Appendix A QUICK START GUIDE	51

1 UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto **HHV7 ELITE MGB® Kit** é um ensaio qualitativo e quantitativo da amplificação de ácidos nucleicos para a **detecção e quantificação do ADN do vírus humano herpes 7 (HHV7)** em amostras de ADN extraídas de sangue total colhido em EDTA e plasma colhido em EDTA e líquido cefalorraquidiano (LCR).

O ensaio é validado em associação com os instrumentos ELITE InGenius® e ELITE BeGenius®, automatizados e integrados para extração, PCR em tempo real e interpretação de resultados, utilizando amostras humanas de sangue total e plasma colhidas em EDTA.

O ensaio está validado em associação com o **7300 Real-Time PCR System** e o **7500 Real-Time PCR System**, usando amostras humanas de sangue total, plasma colhido em EDTA e líquido cefalorraquidiano.

O produto destina-se para utilização no diagnóstico e monitorização de infeções de HHV7, junto com dados clínicos do doente e outros resultados de teste de laboratório.

2 PRINCÍPIOS DO ENSAIO

O ensaio é uma PCR em tempo real quantitativo que deteta ADN de HHV7, isolado de amostras e amplificado usando o reagente do ensaio **HHV7 Q PCR Mix** que contém primers e sondas com tecnologia ELITE MGB e TaqMan™ MGB®.

As sondas ELITE MGB e TaqMan MGB são ativadas quando hibridizam com os correspondentes produtos da PCR. **ELITE InGenius** e o **ELITE BeGenius** monitorizam o aumento da fluorescência e calculam os ciclos de limiar (Ct) e as temperaturas de fusão (Tm). A quantidade de ADN de HHV7 é calculada com base numa curva de calibração armazenada.

Nas sondas ELITE MGB, os fluoróforos são inativados no estado de cadeia única de espiral aleatória da sonda. Os fluoróforos são ativados no duplex amplicon / sonda dado que o inativador está espacialmente separado do fluoróforo.

Ressalva-se que o fluoróforo não é clivado durante a PCR e pode ser utilizado para a análise da dissociação e o cálculo da temperatura de fusão.

3 DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O **HHV7 ELITE MGB Kit** fornece o reagente do ensaio **HHV7 Q - PCR Mix**, uma mistura de PCR otimizada e estabilizada que contém os primers e sondas específicos de:

- HHV7, região do **gene da proteína do capsídeo (U57)**, detetado no Canal **HHV7**; a sonda é estabilizada por MGB, inativada pelo Eclipse Dark Quencher® e é marcada pelo corante FAM.
- Internal Control (IC), específico para o IC2 da sequência de ADN artificial, detetado no Canal **IC**; a sonda é estabilizada por MGB, inativada pelo Eclipse Dark Quencher e identificada pelo corante AquaPhluor® 525 (AP525).

A **HHV7 Q - PCR Mix** contém também tampão, cloreto de magnésio, trifosfatos nucleótidos, fluoróforo AP593 (análogo do ROX ou Cy5) como referência passiva para normalização da fluorescência, a enzima Uracil-N-glicosidase (UNG) para inativar a contaminação pelo produto de amplificação e a polimerase de ADN de início a quente.

O produto **HHV7 ELITE MGB Kit** contém reagentes suficientes para **96 testes** no **ELITE InGenius** and **ELITE BeGenius**, utilizando **20 µL** por reação.

O **HHV7 ELITE MGB Kit** contém reagentes suficientes para **100 testes noutros sistemas**, com **20 µL usados por reação**.

O **HHV7 ELITE MGB Kit** também pode ser usado em associação com outros instrumentos equivalentes.

4 MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Table 1

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
HHV7 Q - PCR Mix ref. RTS037PLD	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 esterilizadas com filtro de aerossóis ou pontas esterilizadas de deslocação positiva (intervalo de volume: 0,5 - 1000 µL).
- Tubos com tampa de rosca esterilizados de 2,0 mL (Sarstedt, Alemanha, ref. 72.694.005).
- Tubos com tampa de rosca esterilizados de 0,5 mL (Sarstedt, Alemanha, ref. 72.730.005)
- Água de qualidade para biologia molecular.

6 OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

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

Para a extração automática de ácidos nucleicos, 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) Software ELITE InGenius versão 1.3.0.19 (ou mais recente) HHV7 ELITE_PC, protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Positive Control HHV7 ELITE_NC, protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Negative Control HHV7 ELITE_STD, protocolo do ensaio com parâmetros para a análise dos Calibradores HHV7 ELITE_WB_200_100, Protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostra do sangue total HHV7 ELITE_PL_200_100, Protocolo de Ensaio com parâmetros para análise de amostra de plasma</p>	<p>HHV7 ELITE Standard (EG SpA, ref. STD037PLD) HHV7 ELITE — ELITE Positive Control (EG SpA, ref. CTR037PLD) CPE – Internal Control (EG SpA, ref. CTRCPE) ELITE InGenius SP200 (EG SpA, ref. INT032SP200) Consumíveis ELITE InGenius e ELITE BeGenius (ver instruções de utilização ELITE InGenius e ELITE BeGenius)</p>
<p>ELITE BeGenius (EG SpA ref. INT040) Software ELITE BeGenius versão 2.3.0. (ou superior) HHV7 ELITE_Be_PC, protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Positive Control HHV7 ELITE_Be_NC, protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Negative Control HHV7 ELITE_Be_STD, protocolo do ensaio com parâmetros para a análise dos Calibradores HHV7 ELITE_Be_WB_200_100, protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostra do sangue total HHV7 ELITE_Be_PL_200_100, Protocolo de Ensaio com parâmetros para análise de amostra de plasma</p>	
<p>7300 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, ref. 4351101) QIASymphony® SP/AS (QIAGEN GmbH, Ref. 9001297, 9001301) NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux SA, Ref. 200111)</p>	<p>HHV7 ELITE Standard (EG SpA, ref. STD037PLD) HHV7 ELITE — ELITE Positive Control (EG SpA, ref. CTR037PLD) CPE – Internal Control (EG SpA, ref. CTRCPE) MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (LifeTechnologies, ref. N8010560) QIASymphony® Midi kit (QIAGEN GmbH, Ref. 931236) NucliSENS® easyMAG® Reagents (bioMérieux SA, Ref. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135)</p>
<p>7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, ref. 4406985) QIASymphony SP/AS (QIAGEN GmbH, Ref. 9001297, 9001301) NucliSENS easyMAG (bioMérieux SA, Ref. 200111)</p>	<p>HHV7 ELITE Standard (EG SpA, ref. STD037PLD) HHV7 ELITE — ELITE Positive Control (EG SpA, ref. CTR037PLD) CPE – Internal Control (EG SpA, ref. CTRCPE) MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL (Life Technologies, ref. 4346906) QIASymphony Midi kit (QIAGEN GmbH, Ref. 931236) NucliSENS easyMAG Reagents (bioMérieux SA, Ref. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135)</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. 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 utilizados para realizar o ensaio como se fossem infecciosos. Evite o contacto direto com os reagentes. Evite salpicos ou pulverização. Os resíduos devem ser manuseados e eliminados de acordo com as normas de segurança adequadas. O material combustível descartável deve ser incinerado. 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.

Quando a sessão de amplificação for configurada manualmente, é necessário ter disponíveis áreas separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação. Nunca introduza um produto de amplificação na área designada para a extração/preparação de reações de amplificação.

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

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

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

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

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

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

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

7.3 Avisos e precauções específicos para os componentes

Table 3

Componente	Temperatura de armazenamento	Utilização a partir da primeira abertura	Ciclos de congelação / descongelação	Estabilidade de bordo (ELITE InGenius e ELITE BeGenius)
HHV7 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 ELITE InGenius and ELITE BeGenius

8.1 Amostras

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

Table 4

Amostra	Requisitos de colheita	Condições de transporte/armazenamento			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2 / +8 °C	-20 ±10 °C	-70 ±15 °C
Sangue Total	EDTA	≤ 24 horas	≤ 72 horas	≤ 1 mês	> 1 mês
Plasma	EDTA	≤ 24 horas	≤ 72 horas	≤ 1 mês	> 1 mês

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 IVD foram especificamente validados com o **ELITE InGenius** ou **ELITE BeGenius** com as matrizes indicadas.

Table 5 Protocolos de ensaio para o HHV7 ELITE MGB Kit

Amostra	Instrumento	Nome do protocolo de ensaio	Relatório	Características
Sangue total	ELITE InGenius	HHV7 ELITE_WB_200_100	cópias/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 da PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 10 µL
	ELITE BeGenius	HHV7 ELITE_Be_WB_200_100	cópias/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 da PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 10 µL
Plasma	ELITE InGenius	HHV7 ELITE_PL_200_100	cópias/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 da PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 10 µL
	ELITE BeGenius	HHV7 ELITE_Be_PL_200_100	cópias/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 da PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 10 µL

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 ou 1000 µL de amostra devem ser transferidos para o tubo de extração (para o ELITE InGenius) ou 200 µL de amostra devem ser transferidos para um tubo Sarstedt de 2 mL (para o ELITE BeGenius).

NOTE

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

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 "Advertências e precauções".

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 Características de Desempenho para verificar os dados relativos a substâncias interferentes.

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

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

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

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 **HHV7 ELITe Standard** (não fornecido com este kit) com os protocolos do ensaio **HHV7 ELITe_STD** ou **HHV7 ELITe_Be_STD**.
- Para o Positive Control, use o produto **HHV7 - ELITe Positive Control** (não fornecido com este kit) com os protocolos de ensaio **HHV7 ELITe_PC** ou **HHV7 ELITe_Be_PC**.
- Para o Negative Control, utilize água de grau biológico molecular (não fornecida com este kit) com os protocolos de ensaio **HHV7 ELITe_NC** ou **HHV7 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 Positive e Negative Controls.

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

- se for usado um novo lote de reagentes,
- os resultados da análise de controlo da qualidade se encontrarem fora da especificação (ver o parágrafo seguinte),
- for realizada qualquer reparação ou manutenção significativa 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 HHV7 ELITe MGB Kit com o ELITe InGenius é composto por três passos:

Table 6

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

9.1 PASSO 1 – Verificação da disponibilidade do sistema

Antes de iniciar a sessão:

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

Os protocolos para análise qualitativa estão disponíveis a pedido.

9.2 PASSO 2 – Configuração da sessão

OHHV7 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),
- 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** em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

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	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. Descongele os tubos de CPE necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Cada tubo é suficiente para 12 extrações.	Descongele o 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.
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.
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.

	A. Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair +PCR])	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])
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 **HHV7 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 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 **software ELITe InGenius** interpreta os resultados de PCR para o alvo (canal **HHV7**) e o Internal Control (canal **IC**) com os parâmetros dos protocolos de ensaio **HHV7 ELITe_WB_200_100** e **HHV7 ELITe_PL_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.

Table 7

1) Curva de calibração	Estado
HHV7 Q-PCR Standard	APROVADO
2) Positive Control	Estado
HHV7 Positive Control	APROVADO

Table 7 (continued)

1) Curva de calibração	Estado
3) Negative Control	Estado
HHV7 Negative Control	APROVADO

Os resultados da amostra são automaticamente interpretados pelo **software ELITE InGenius** usando os parâmetros do Assay Protocol (Protocolo do ensaio).

Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado.

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

Table 8

Resultado da execução da amostra	Interpretação
HHV7:DNA Detected, quantity equal to "XXX" copies/mL (HHV7:DNA detetado, quantidade igual a "XXX" cópias/mL)	Foi detetado ADN de HHV7 na amostra no intervalo de medição de ensaio, a sua concentração é mostrada.
HHV7:DNA Detected, quantity below "LLoQ" copies/mL (HHV7:DNA detetado, quantidade abaixo "LLoQ" cópias/mL ou IU/mL)	Foi detetado ADN de HHV7 na amostra, a sua concentração é inferior ao ensaio - limite inferior de quantificação
HHV7:DNA Detected, quantity beyond "ULoQ" copies/mL (HHV7:DNA detetado, quantidade além de "ULoQ" cópias/mL)	Foi detetado ADN de HHV7 na amostra, a sua concentração é superior ao ensaio - limite superior de quantificação
HHV7:DNA Not detected or below the "LoD" copies/mL (HHV7:DNA não detetado ou abaixo de "LoD" cópias/mL ou IU/mL)	Não foi detetado ADN de HHV7 na amostra. A amostra é negativa para ADN do alvo ou a sua concentração está abaixo do limite de deteção do ensaio.
Invalid-Retest Sample (Inválido-Testar novamente a amostra)	Resultado do ensaio inválido devido a falha do Internal Control (devido, p.ex., a extração incorreta, transferência de inibidores). O teste deve ser repetido.

Amostras indicadas como "Invalid-Retest Sample" (Inválido-testar novamente amostra): neste caso, o ADN do Internal Control 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 o volume de eluato for suficiente, o eluato pode ser testado novamente (tal como está ou diluído) através de uma execução de amplificação no modo "PCR Only" (Apenas PCR). Se o segundo resultado for inválido, a amostra deve ser novamente testada a partir da extração de uma nova amostra utilizando o modo "Extract + PCR" (Extract+PCR) (ver "[17 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS page 45](#)")

As amostras reportadas como "HHV7:DNA Not detected or below "LoD" copies/mL" (HHV7:DNA não detetado ou abaixo do "LoD" de cópias/mL) são adequadas para análise mas não foi detetado HHV7. Neste caso, a amostra pode ser negativa para ADN de HHV7 ou o ADN de HHV7 está presente numa concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver "[11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM ELITE InGenius e ELITE BeGenius page 24](#)").

Amostras positivas do ADN de HHV7 a uma concentração abaixo do Limite de Deteção (e Limite Inferior da Quantificação) do ensaio, se detetado, são relatadas como "HHV7:DNA Detected, quantity below LLoQ copies/ /mL" (HHV7:DNA detetado, quantidade abaixo de "LLoQ" cópias/mL) (ver "[11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM ELITE InGenius e ELITE BeGenius page 24](#)").

São detetadas amostras positivas de ADN de HHV7 no Intervalo de Medição Linear (ver "[11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM ELITE InGenius e ELITE BeGenius page 24](#)") que são relatadas como "HHV7:DNA Detected, quantity equal to "XXX" copies / mL" (HHV7:DNA detetado, quantidade igual a "XXX" cópias/mL).

Amostras positivas de ADN de HHV7 que estão acima do Limite Superior de Quantificação são relatadas como “HHV7:DNA Detected, quantity beyond “ULoQ” copies/mL” (HHV7:DNA detetado, quantidade além de “ULoQ” cópias/mL) e não são adequadas para quantificação. Se necessário a amostra pode ser diluída antes da extração ou PCR e novamente testada de forma a serem obtidos resultados dentro do intervalo de medição linear do ensaio.

NOTE

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

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

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 Rastreo 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 HHV7 ELITE MGB Kit com o ELITE BeGenius é composto por três passos:

Table 9

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

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

Os protocolos para análise qualitativa estão disponíveis a pedido.

10.2 PASSO 2 – Configuração da sessão

OHHV7 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** em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

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>Se necessário, 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”.

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])
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, assinala "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.	Não aplicável
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
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.

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])
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	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").
9	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
10	Carregue a PCR Mix no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).	Carregue a PCR Mix no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).
11	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).
12	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
13	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.
14	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
15	Carregue o "PCR Rack" (Rack de PCR) com a " PCR Cassette " na Inventory Area (área dos reagentes).	Carregue o "PCR Rack" (Rack de PCR) com a " PCR Cassette " na Inventory Area (área dos reagentes).
16	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
17	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
18	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 **HHV7 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 ELITE InGenius e ELITE BeGenius

11.1 Sensibilidade analítica: Limite de branco com sangue total

Devido à elevada prevalência de HHV7 na população (cerca de 80%) referida na literatura (Michael Kidd et al.), espera-se uma certa percentagem de resultados positivos baixos clinicamente não significativos quando se analisam amostras de sangue total. Para obter a negatividade do ensaio com estas amostras, foi necessário avaliar um valor-limite de HHV7 Ct igual a 35 no **ELITE InGenius** e no **ELITE BeGenius**.

Os resultados no ELITE InGenius são apresentados na tabela abaixo:

Table 10

Limite de branco do sangue total colhido em EDTA e ELITE InGenius			
Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA e negativo para ADN de HHV7	35	0	35

Os resultados no ELITE BeGenius são apresentados na tabela abaixo:

Table 11

Limite de branco do sangue total colhido em EDTA e ELITE BeGenius			
Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA e negativo para ADN de HHV7	20	0	20

No teste Limite de branco, o HHV7 ELITE MGB Kit detetou corretamente todas as amostras testadas, como esperado, dentro do valor-limite Ct definido para o alvo.

11.2 Sensibilidade analítica: Limite de deteção (LdD)

O Limite de deteção (LoD) da amplificação de ADN permite detetar a presença de cerca de 10 cópias em 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

O LdD deste ensaio foi testado no ELITE InGenius utilizando ADN de plasmídeo contendo o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida por espectrofotómetro. O ADN de plasmídeo foi diluído até um título de 10 cópias / 10 µL na presença de ADN de plasmídeo contendo o Internal Control a um título de 20.000 cópias / 10 µL.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 12

Amostras	N	positivo	negativo
10 cópias de ADN de plasmídeo HHV7 + 20.000 cópias de Internal Control	18	18	0

O valor teórico do LdD foi verificado testando no ELITE InGenius e no ELITE BeGenius um painel de plasma em EDTA e sangue total em EDTA com material de referência do HHV7 (ZeptoMetrix, ref. PINATHHV7-ST) na concentração indicada.

Os resultados obtidos confirmaram a concentração indicada para o alvo do HHV7 ELITE MGB Kit no ELITE InGenius e no ELITE BeGenius.

11.3 Intervalo de medição linear

O intervalo de medição linear do HHV7 ELITE MGB Kit foi determinado com amostras de sangue total e de plasma no ELITE InGenius e no ELITE BeGenius.

Para Sangue Total:

O intervalo de medição linear foi determinado utilizando um painel de diluições de plasmídeo contendo a sequência-alvo do HHV7 em amostras negativas de sangue total em EDTA.

Os resultados são comunicados na figura seguinte.

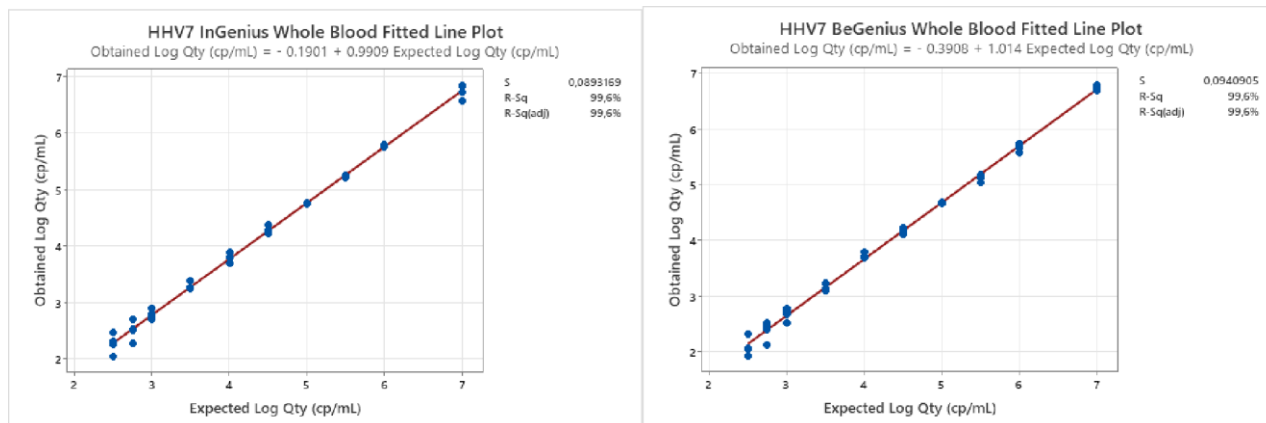


Fig. 1

O intervalo de medição linear como cópias/mL para o plasma em EDTA é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado na secção seguinte.

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

Os resultados estão resumidos na figura seguinte.

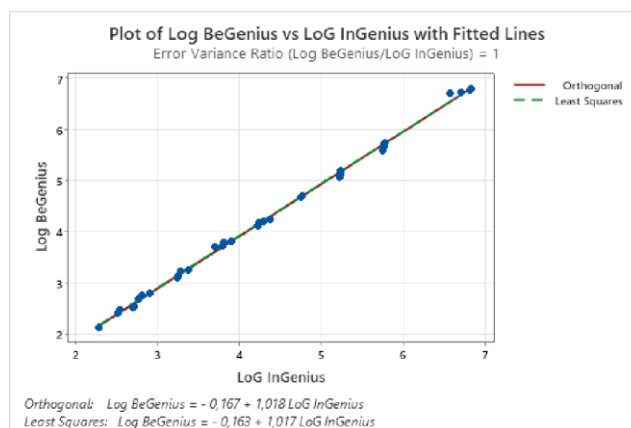


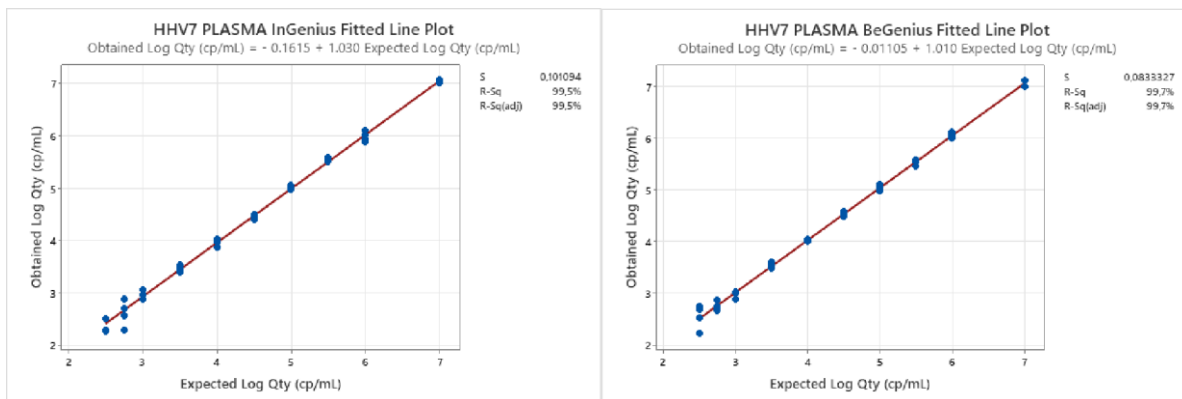
Fig. 2

A análise de regressão ortogonal gerou um declive igual a -0,167 (95% CI: -0,2256; -0,1075) e um declive igual a 1,018 (95% CI: 1,0048, 1,0307). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0,999.

Para plasma colhido em EDTA:

O intervalo de medição linear foi determinado utilizando um painel de diluições de plasmídeo contendo a sequência-alvo do HHV7 em amostras negativas de plasma em EDTA.

Os resultados são comunicados na figura seguinte.



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

Os resultados estão resumidos na figura seguinte.

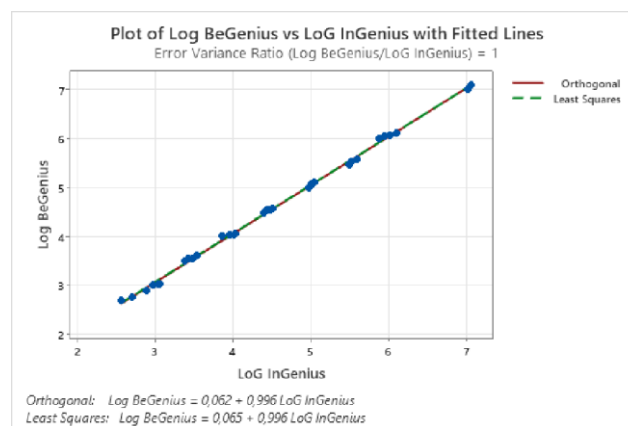


Fig. 3

A análise de regressão ortogonal gerou uma interceção equivalente a 0,062 (95% CI 0,0053; 0,1194) e um declive igual a 0,996 (95% CI: 0,9845; 1,0082). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0,999.

O intervalo de medição linear para amostras de sangue total e plasma colhidas em EDTA abrange um intervalo de concentração conforme indicado na tabela seguinte:

Table 13

Intervalo de medição linear para HHV7 ELITE MGB Kit e ELITE InGenius e ELITE BeGenius		
Matriz	Limite inferior	Limite superior
Sangue Total	500 cópias/mL	10.000.000 cópias/mL
Plasma	500 cópias/mL	10.000.000 cópias/mL

11.4 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 0,2181 Log cópias / reação.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 14 Incerteza da curva de standard

Níveis da curva de standard	Teórico	SD	Incerteza combinada alargada
	Log c/rxn		
HHV7 Q - PCR Standard 10 ⁵	5,0000	0,0711	0,2181
HHV7 Q - PCR Standard 10 ⁵	4,0000	0,0372	
HHV7 Q - PCR Standard 10 ⁵	3,0000	0,0261	
HHV7 Q - PCR Standard 10 ⁵	2,0000	0,0691	

11.5 Repetibilidade

A repetibilidade do ensaio foi avaliada no ELITe BeGenius e no ELITe InGenius através da análise de um painel de amostras de sangue total colhido em EDTA negativas ou enriquecidas com HHV7 (ZeptoMetrix, ref. PINATHHV7-ST).

Um exemplo dos resultados da repetibilidade intra-sessão (em um dia) no ELITe InGenius são mostrados na tabela seguinte.

Table 15

Repetibilidade intra-sessão no ELITe InGenius					
Amostra	HHV7				%Concordância
	Pos./Neg.	Ct médio	SD	% CV	
Negativo	0 / 8	N/A	N/A	N/A	100%
3X LOD	8 / 8	32,97	0,38	1,14	100%
10X LOD	8 / 8	31,18	0,29	0,92	100%

Um exemplo dos resultados da repetibilidade intra-sessão (em um dia) no ELITe BeGenius são mostrados na tabela seguinte.

Table 16

Repetibilidade intra-sessão no ELITe BeGenius					
Amostra	HHV7				%Concordância
	Pos./Neg.	Ct médio	SD	% CV	
Negativo	0 / 8	N/A	N/A	N/A	100%
3X LOD	8 / 8	34,52	0,30	0,88	100%
10X LOD	8 / 8	32,36	0,22	0,69	100%

Os resultados da Repetibilidade inter-sessão (em dois dias) on ELITe InGenius são mostrados na tabela abaixo.

Table 17

Repetibilidade inter-sessão no ELITE InGenius					
Amostra	HHV7				%Concordância
	Pos./Neg.	Ct médio	SD	% CV	
Negativo	0 / 16	N/A	N/A	N/A	100%
3X LOD	16 / 16	33,07	0,36	1,09	100%
10X LOD	16 / 16	31,17	0,24	0,77	100%

Os resultados da Repetibilidade inter-sessão (em dois dias) on ELITE BeGenius são mostrados na tabela abaixo.

Table 18

Repetibilidade inter-sessão no ELITE BeGenius					
Amostra	HHV7				%Concordância
	Pos./Neg.	Ct médio	SD	% CV	
Negativo	0 / 16	N/A	N/A	N/A	100%
3X LOD	16 / 16	34,41	0,49	1,42	100%
10X LOD	16 / 16	32,34	0,30	0,92	100%

No teste de repetibilidade, o HHV7 ELITE MGB Kit detetou todas as amostras como esperado e apresentou uma variabilidade máxima dos valores Ct alvo como %CV igual a 1,42%.

11.6 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do ensaio foi avaliada no ELITE BeGenius e no ELITE InGenius através da análise de amostras de sangue total negativas para o ADN do HHV7, colhidas em EDTA negativo ou enriquecidas com HHV7 (ZeptoMetrix, ref. PINATHHV7-ST).

Os resultados da Reprodutibilidade Interlote (dois lotes) no ELITE InGenius são apresentados na tabela abaixo.

Table 19

Reprodutibilidade interlote no ELITE InGenius					
Amostra	HHV7				%Concordância
	Pos. / Rep.	Ct médio	SD	%CV	
Negativo	0 / 8	-	-	-	100%
3 X LdD	8 / 8	33,39	0,20	0,59	100%
10 X LdD	8 / 8	31,39	0,18	0,57	100%

Os resultados da Reprodutibilidade Interlote (dois lotes) no ELITE BeGenius são apresentados na tabela abaixo.

Table 20

Reprodutibilidade interlote no ELITE BeGenius					
Amostra	HHV7				%Concordância
	Pos. / Rep.	Ct médio	SD	%CV	
Negativo	0 / 8	-	-	-	100%
3 X LdD	8 / 8	34,58	0,14	0,42	100%
10 X LdD	8 / 8	32,66	0,24	0,75	100%

Os resultados da reprodutibilidade inter-instrumento (em dois dias, dois lotes e dois instrumentos) no ELITE InGenius Elite mostrados na tabela abaixo.

Table 21

Reprodutibilidade interinstrumento no ELITE InGenius					
Amostra	HHV7				%Concordância
	Pos. / Rep.	Ct médio	SD	%CV	
Negativo	0 / 8	-	-	-	100%
3 X LdD	8 / 8	34,50	0,31	0,90	100%
10 X LdD	8 / 8	32,61	0,23	0,69	100%

Os resultados da reprodutibilidade inter-instrumento (em dois dias, dois lotes e dois instrumentos) no ELITE BeGenius Elite mostrados na tabela abaixo.

Table 22

Reprodutibilidade interinstrumento no ELITE BeGenius					
Amostra	HHV7				%Concordância
	Pos. / Rep.	Ct médio	SD	%CV	
Negativo	0 / 8	-	-	-	100%
3 X LdD	8 / 8	33,25	0,26	0,79	100%
10 X LdD	8 / 8	31,26	0,21	0,66	100%

No teste de reprodutibilidade, o HHV7 ELITE MGB Kit detetou todas as amostras como esperado e apresentou uma variabilidade máxima dos valores Ct alvo como %CV igual a 0,90%.

11.7 Especificidade do diagnóstico: Confirmação de amostras negativas

A especificidade diagnóstica do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi avaliada em associação com o **ELITE InGenius** através da análise de amostras clínicas de sangue total e plasma colhidas em EDTA.

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 diagnóstica do ensaio obtida em associação com o **ELITE InGenius** também se aplica ao **ELITE BeGenius**.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 23

Amostras	N	positivo	negativo	% de especificidade do diagnóstico
Amostras de sangue total colhidas em EDTA	38	0	38	100%
Amostras de plasma colhidas em EDTA	33	0	33	100%

Todas as amostras de sangue total e plasma foram válidas para a análise. O valor limite de Ct do alvo de HHV7 foi aplicado apenas para as amostras de sangue total.

A especificidade diagnóstica do HHV7 ELITE MGB Kit em associação com o sangue total e o plasma colhidas em EDTA foi igual a 100%.

O valor-limite de Ct do CI foi definido para 35 para as amostras de sangue total e de plasma colhidas em EDTA tanto para o InGenius como para o BeGenius.

11.8 Sensibilidade de diagnóstico: Confirmação de amostras positivas

A sensibilidade diagnóstica 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 e plasma colhidas em EDTA.

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 obtida em associação com o **ELITE InGenius** também se aplica ao **ELITE BeGenius**.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando amostras de sangue total e plasma colhidas em EDTA negativas para HHV7 reforçadas com "Human Herpes Virus Type 7 Stock – (NATHHV7-ST)" (ZeptoMetrix Corporation) a 1000 cópias / mL.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 24

Amostras	N	positivo	negativo	%Sensibilidade de diagnóstico
Sangue total colhido em EDTA reforçado para ADN de HHV7	34	34	0	100%
Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de HHV7	33	33	0	100%

Todas as amostras foram detetadas corretamente como sendo positivas.

A sensibilidade do diagnóstico do HHV7 ELITE MGB Kit em associação com o sangue total e o plasma colhidas em EDTA foi igual a 100%.

NOTE

Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e o instrumento estão registados no Ficheiro técnico do produto "HHV7 ELITE MGB Kit", FTP037PLD.

12 AMOSTRAS E CONTROLOS PARA OUTROS SISTEMAS

12.1 Amostras

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

12.2 Sangue total colhido em EDTA

As amostras de sangue total para extração de ADN devem ser colhidas em EDTA de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas a e guardadas à temperatura ambiente (+16/+26 °C) durante um período máximo de 24 horas, a +2/+8 °C durante um período máximo de três dias, caso contrário, devem ser congeladas e guardadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

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

NOTE

Quando realizar a extração de ADN a partir de sangue total com o instrumento **NucliSENS® easyMAG®**, siga o protocolo de extração **Generic 2.0.1** e as seguintes instruções: transfira **100 µL** de amostra para a tira de 8 poços, carregue a tira no instrumento e execute a extração sem incubação de lise. Depois de o instrumento ter adicionado o **NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer**, sem retirar a tira, misture três vezes o conteúdo da tira com a pipeta multicanal fornecida, utilizando o programa número 3. Incube durante 10 minutos e, em seguida, adicione **5 µL** de **CPE** para o Internal Control e o **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** ao conteúdo da tira com a pipeta multicanal utilizando o programa número 3 e proceda à extração. Elua os ácidos nucleicos em **50 µL** de tampão de eluição.

NOTE

Quando realizar a extração de ADN a partir de sangue total com o instrumento **QIASymphony® SP/AS** e o kit **QIASymphony® DNA Mini kit** com a **versão 3.5 do software**, utilize o protocolo de extração **Virus Blood_200_V4_default IC** e siga estas instruções: o instrumento é capaz de usar um tubo primário, o volume da amostra necessário para a extração é de **200 µL**, é sempre necessário um volume morto mínimo de 100 µL. Adicione **5 µL** de **CPE** para cada amostra solicitada ao tampão ATE. Carregue no instrumento, na ranhura do "Internal Control", os tubos que contêm a solução, como indicado no manual do utilizador do kit; indique a posição onde os eluatos serão distribuídos e especifique o volume de eluição de **60 µL**. Para obter mais informações sobre o procedimento de extração, siga as indicações no manual de utilizador do kit.

12.3 Líquido cefalorraquidiano

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

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

NOTE

Quando realizar a extração de ADN a partir de amostras de líquido cefalorraquidiano com o instrumento **NucliSENS® easyMAG®**, siga o protocolo de extração **Generic 2.0.1** e as seguintes instruções: transfira **500 µL** de amostra para a tira de 8 poços e execute a extração. Após a incubação de 10 minutos, adicione **5 µL** de **CPE** para o Internal Control antes de adicionar o **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** e proceda à extração. Elua os ácidos nucleicos em **100 µL** de tampão de eluição.

12.4 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.

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

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

12.5 Controlos de amplificação

É absolutamente obrigatório validar cada 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, utilize o produto **HHV7 - ELITe Positive Control** ou o produto **HHV7 ELITe Standard**.

12.6 Controlos da qualidade

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

13 PROCEDIMENTO NOUTROS SISTEMAS

13.1 Definição da sessão de amplificação em tempo real

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

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

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

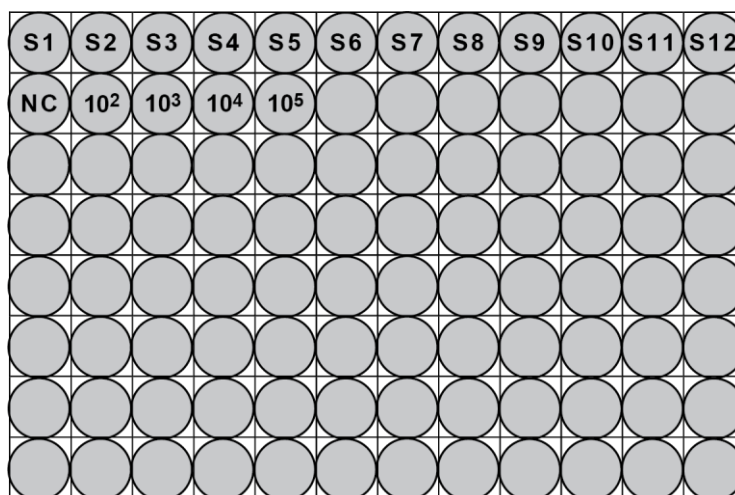
- ligar o ciclo térmico em tempo real, ligar o computador, executar o software dedicado e abrir uma sessão "quantificação absoluta";
- defina (Gestor do detetor) o "detetor" (detetor) para a sonda HHV7 com o "reporter" (reportador) = "FAM", o "quencher" (inativador) = "none" (nenhum) (não fluorescente) e dê-lhe o nome "HHV7";
- 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 "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) e dar-lhe o nome "IC";
- para cada poço em utilização na microplaca, defina (Inspetor de poços) o "detetor" (detetor) (tipo de fluorescência a ser medida), a "passive reference" (referência passiva) = "ROX" (AP593 é utilizado em vez de ROX, normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (amostra, controlo de amplificação negativo, controlo de amplificação positivo ou standard de quantidade conhecida). Adicione esta informação à **Ficha de trabalho**

anexada no final deste manual ou imprima a preparação da microplaca. A **Ficha de trabalho** deve ser atentamente seguida durante a transferência da mistura de reação e das amostras para os furos.

NOTE

Para determinar o título ADN na amostra inicial, prepare uma série de reações com o **Q - PCR Standards** (10⁵ cópias, 10⁴ cópias, 10³ cópias, 10² cópias) para obter a **Curva standard**

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



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

10²: 10² cópias standard; **10³:** 10³ cópias standard; **10⁴:** 10⁴ cópias standard; **10⁵:** 10⁵ cópias standard.

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

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

NOTE

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

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

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

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

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

Table 25

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

Table 26

Amplificação e detecção (45 ciclos)	94 °C	10 seg.
	60 °C (aquisição de fluorescência)	30 seg.
	72 °C	20 seg.

Table 27

Dissociação (opcional)	95 °C	15 seg.
	40 °C	30 seg.
	80 °C	15 seg.

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

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

- Ligue o ciclo térmico em tempo real, ligue o computador, execute o software dedicado, abra uma sessão "quantificação absoluta" e defina o "Run mode: Rápido 7500".
- Defina (Gestor do detetor) o "detetor" (detetor) para a sonda HHV7 com o "reporter" (reportador) = "FAM", o "quencher" (inativador) = "none" (nenhum) (não fluorescente) e dê-lhe o nome "HHV7";
- Defina (Gestor do detetor) o "detetor" (detetor) para a sonda de controlo interno com o "reporter" (reportador) = "VIC" (AP525 é semelhante ao VIC) e o "quencher" (inativador) = "none" (nenhum) (não fluorescente) e dê-lhe o nome "IC";
- Para cada poço em utilização na microplaca, defina (Inspetor de poços) o "detetor" (detetor) (tipo de fluorescência a ser medida), a "passive reference" (referência passiva) = "Cy5" (AP593 é utilizado em vez de Cy5, normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (amostra, controlo de amplificação negativo, controlo de amplificação positivo ou standard de quantidade conhecida). Adicione esta informação à **Ficha de trabalho** anexada no final deste manual ou imprima a preparação da microplaca. A **Ficha de trabalho** deve ser atentamente seguida durante a transferência da mistura de reação e das amostras para os furos.

NOTE

Para determinar o título ADN na amostra inicial, prepare uma série de reações com o **Q - PCR Standards** (10⁵ cópias, 10⁴ cópias, 10³ cópias, 10² cópias) para obter a **Curva standard**.

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

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

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

NOTE

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

- Modifique o tempo como indicado na tabela "**Ciclo térmico**" abaixo.
- Defina o número de ciclos para **45**.
- Defina o volume para a emulação de software de transferência térmica para a reação ("Volume da amostra") para **30 µL**.
- Opcional: adicione a fase de dissociação (Adicionar fase de dissociação) e defina a temperatura de **40 °C a 80 °C**.

Table 28

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

Table 29

Amplificação e detecção (45 ciclos)	94 °C	10 seg.
	60 °C (aquisição de fluorescência)	30 seg.
	72 °C	20 seg.

Table 30

Dissociação (opcional)	95 °C	15 seg.
	40 °C	1 min.
	80 °C	15 seg.
	60 °C	15 seg.

13.2 Preparação da amplificação

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

Antes de iniciar a sessão, é necessário:

- retire e descongele os tubos que contêm as amostras a serem analisadas. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo;
 - retire e descongele os tubos da **HHV7 Q - PCR Mix** necessários para a sessão, sem esquecer que cada tubo é suficiente para a preparação de **25 reações**. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo;
 - retire e descongele os tubos de **HHV7 - Positive Control** ou de **HHV7 Q - PCR Standard**. Misture-os suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo;
 - pegue na **microplaca da amplificação** que será usada durante a sessão, tendo cuidado para manusear a mesma com luvas sem pó e para não danificar os furos.
 - pegue na **Folha vedante da amplificação** que será usada durante a sessão, tendo cuidado para manusear a mesma com luvas sem pó e para não a danificar.
1. Pipete exatamente **20 µL** de **HHV7 Q - PCR Mix** no fundo dos poços da **Microplaca de amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Evite a criação de bolhas.

NOTE

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

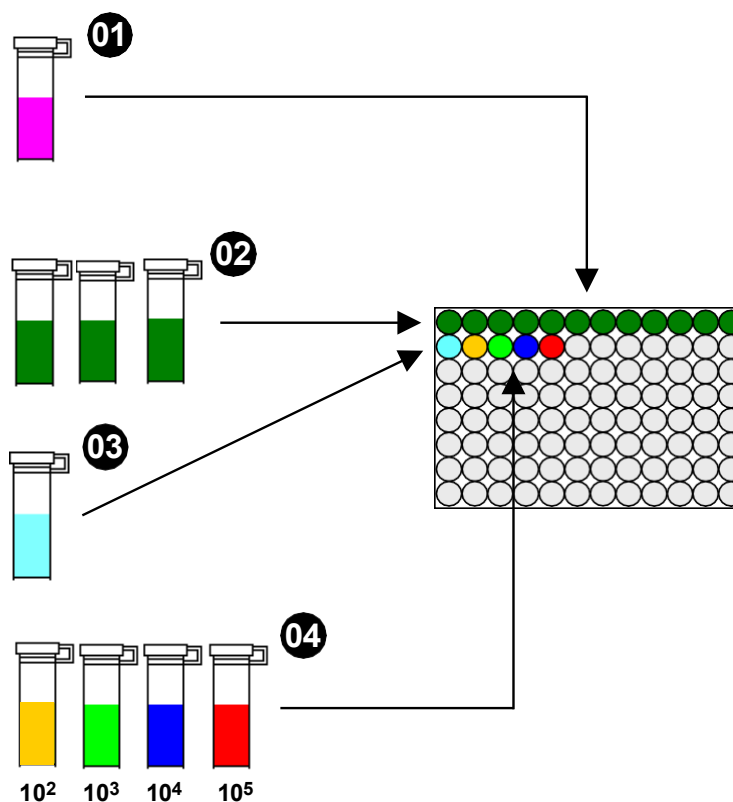
2. Com a pipeta, introduza exatamente, colocando na mistura de reação, **10 µL** de **ADN extraído** da primeira amostra no furo correspondente da **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem a amostra introduzindo com a pipeta o **ADN extraído** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma com as outras amostras de **ADN extraído**.
3. Com a pipeta, introduza exatamente, colocando na mistura de reação, 10 µL de água de qualidade para biologia molecular. (não fornecido com este produto) no poço da microplaca de amplificação do Negative Control de amplificação, como previamente estabelecido na Ficha de trabalho. Misture bem o Negative Control pipetando a água de grau de biologia molecular três vezes para a mistura de reação. Evite a criação de bolhas.
4. Com base no resultado necessário (qualitativo ou quantitativo), deve seguir uma das destas duas opções:
 - Quando for necessário um resultado **qualitativo** (detecção de ADN de HHV7): pipete, colocando na mistura de reação, exatamente **10 µL** de **HHV7 - Positive Control** no poço correspondente da **microplaca de amplificação**, como estabelecido anteriormente na **Ficha de trabalho**. Misture bem o Positive Control pipetando o volume de 10 µL três vezes para a mistura de reação. Evite a criação de bolhas.

- Quando for necessário um resultado **quantitativo** (quantificação de ADN de HHV7): pipete, colocando na mistura de reação, exatamente **10 µL** de **HHV7 Q - PCR Standard 102** no poço correspondente da microplaca de amplificação, como estabelecido anteriormente na **Ficha de trabalho**. Misture bem o standard introduzindo com a pipeta o volume de 10 µL três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma com os **HHV7 Q - PCR Standards 10³, 10⁴, 10⁵**.
5. Vede com precisão a **microplaca da amplificação** com recurso à **folha vedante da amplificação**.
 6. Transfira a **microplaca da amplificação** para o ciclo térmico em tempo real na área de amplificação/ /detecção de produtos de amplificação e inicie o ciclo térmico para a amplificação guardando a definição da sessão com um nome de ficheiro inequívoco e reconhecível (por ex., "ano-mês-dia-HHV7- -ELITECHGROUP").

NOTE

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

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



1. **Adicione 20 µL de Q-PCR Mix**
2. **Adicione 10 µL do ADN extraído**
3. **Adicione 10 µL de Negative Control**
4. **Adicione 10 µL de Positive Control ou Q-PCR Standard**

NOTE

Se a preparação da amplificação for efetuada com o instrumento **QIASymphony® SP/AS**, insira a microplaca que contém os extratos, os reagentes e a microplaca de amplificação nas ranhuras dedicadas, utilizando os adaptadores especiais, e siga as indicações do manual de instruções de utilização do módulo de configuração e os passos requeridos pelo software.

13.3 Análise qualitativa dos resultados

Os valores registados da fluorescência emitida pela sonda específica do HHV7 (detetor FAM "HHV7") e pela sonda específica do Internal Control (detetor VIC "IC") nas reações de amplificação devem ser analisados pelo software do instrumento.

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

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

NOTE

No caso de uma amostra positiva com um elevado título de ADN de HHV7, a fluorescência FAM da sonda específica do HHV7 pode começar a aumentar antes do ciclo 15. Neste caso, o intervalo de cálculo para a **Linha de base** deve ser adaptada desde o ciclo 6 até ao ciclo em que a fluorescência FAM da amostra começa a aumentar, como detetado pelo software do instrumento (Resultados > Componente).

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

- defina manualmente o **Limiar** para o detetor FAM "HHV7" para **0,1**;
- defina manualmente o **Limiar** para o detetor VIC "CI" para **0,05**.

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

- defina manualmente o **Limiar** para o detetor FAM "HHV7" para **0,2**;
- defina manualmente o **Limiar** para o detetor VIC "CI" para **0,1**.

Os valores de fluorescência emitidos pelas sondas específicas na reação de amplificação e o valor do **Limiar** de fluorescência permitem determinar o **Ciclo do limiar (Ct)**, o ciclo em que a fluorescência alcançou o valor do **Limiar**.

Na reação de amplificação **Positive Control ***, o valor de **Ct** do HHV7 (Resultados > Relatório) é usado para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Table 31

Detetor de reação de Positive Control FAM "HHV7"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação **Positive Control** for **Ct > 25** ou **Ct Indeterminada** para HHV7, o ADN alvo não foi corretamente detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação ou deteção (distribuição incorreta da mistura de reação ou do Positive Control, degradação da mistura de reação ou do Positive Control, definição incorreta da posição do Positive Control, definição incorreta do ciclo térmico) que podem originar resultados incorretos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

NOTE

Quando este produto é utilizado para a quantificação do ADN do HHV7, as reações **Q - PCR Standard** são preparadas em vez da reação de **Positive Control**. Neste caso, valide a amplificação e a deteção referindo-se à reação de amplificação do **Q - PCR Standard 10⁵ (Ct ≤ 25)**.

Na reação de amplificação **Negative Control**, o valor de **Ct** do HHV7 (Resultados > Relatório) é usado para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Table 32

Detetor de reação de Negative Control FAM "HHV7"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct não determinado	NEGATIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação para o **Negative control** for diferente de **Ct Undetermined (Indeterminada)** para HHV7, o ADN alvo foi detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação (contaminação), que podem originar resultados incorretos e falsos positivos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

Na reação de amplificação de cada **amostra**, o valor de **Ct** do HHV7 é usado para determinar o ADN alvo, enquanto o valor de **Ct** do Internal Control é usado para validar a extração, amplificação e deteção.

NOTE

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

Este produto é capaz de detetar uma quantidade mínima de cerca de 10 cópias de ADN para a região de um gene da proteína do capsídeo (U57) do HHV7 na reação de amplificação, o que corresponde aos equivalentes de genoma por reação (limite de deteção do produto, ver parágrafo [11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM ELITE InGenius e ELITE BeGenius page 24](#)).

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

Table 33

Reação da amostra		Adequação da amostra	Resultado do ensaio	ADN de HHV7
detetor FAM "HHV7"	detetor VIC "IC"			
Ct não determinado	Ct > 35 ou Ct não determinado	inadequado	inválido	-
	Ct ≤ 35	adequado	válido, negativo	NÃO DETETADO
Ct determinado	Ct > 35 ou Ct não determinado	adequado	válido, positivo	DETETADO
	Ct ≤ 35	adequado	válido, positivo	DETETADO

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct indeterminada** para o HHV7 e **Ct > 35** ou **Ct indeterminada** para o Internal Control, significa que foi impossível detetar eficientemente o ADN para o Internal Control. Neste caso, ocorreram problemas durante o passo de amplificação (amplificação ineficiente ou inexistente) ou durante o passo de extração (degradação do ADN do controlo interno, amostra com um número de células demasiado baixo, perda de ADN durante a extração ou presença de inibidores no ADN extraído) que podem originar resultados incorretos e falsos negativos. A amostra não é adequada, o ensaio é inválido e precisa ser repetido, começando pela extração de uma nova amostra.

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct indeterminada** para o HHV7 e **Ct ≤ 35** para o Internal Control, para o Internal Control, significa que o ADN do HHV7 não é detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode excluir-se o facto de o ADN do HHV7 ter um título mais baixo que o limite de deteção do produto (ver [11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM ELITE InGenius e ELITE BeGenius page 24](#)). Neste caso, o resultado poderia ser um falso negativo.

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

NOTE

Quando o ADN do HHV7 é detetado na reação de amplificação de uma amostra, o Internal Control pode resultar em Ct > 35 ou Ct indeterminada. Na realidade, a reação de amplificação de baixa eficiência para o Internal Control pode ser deslocada por concorrência com a reação de amplificação de elevada eficiência para o ADN do HHV7. Neste caso, a amostra é contudo adequada e o resultado positivo do ensaio é válido.

13.4 Análise quantitativa dos resultados

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

Os valores de **Ct** de HHV7 nas reações de amplificação dos quatro **Q - PCR standards** 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 FAM de "HHV7" da curva de standard	Intervalo de aceitação	Amplificação/deteção
Coefficiente de correlação (R2)	$0,990 \leq R2 \leq 1,000$	CORRETO

Se o valor do **Coefficiente de correlação (R2)** não se encontrar dentro dos limites, isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação ou deteção (distribuição incorreta da mistura de reação ou dos standards, degradação da mistura de reação ou dos standards, definição incorreta da posição dos standards, definição incorreta do ciclo térmico) que pode causar resultados incorretos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

Os valores de **Ct** do HHV7 na reação de amplificação de cada **amostra** e a **Curva standard** da sessão de amplificação são usados para calcular a **Quantidade** de ADN alvo presente nas reações de amplificação das amostras.

Este produto é capaz de quantificar desde 1.000.000 a 10 cópias de ADN da região de um gene de proteína do capsídeo (U57) de HHV7 na reação de amplificação, que corresponde aos Equivalentes do genoma por reação (intervalo de medição linear, consulte parágrafo Características de desempenho), tal como descrito na tabela seguinte:

Table 35

Detetor FAM "HHV7" do resultado da amostra	Equivalentes do genoma HHV7 por reação
Quantidade > 1×10^6	MAIS DE 1.000.000
$1 \times 10^1 \leq$ Quantidade $\leq 1 \times 10^6$	= Quantidade
Quantidade < 1×10^1	MENOS DE 10

Os resultados (**Quantidade**) de cada **amostra** (Resultados > Relatório) são usados para calcular os equivalentes do genoma (**gEq**) do HHV7 presente na amostra usada na extração (**Nc**) de acordo com esta fórmula:

Table 36

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = \frac{Ve \times \text{Quantidade}}{Vc \times Va \times Ep}$$

Onde:

Vc é a quantidade da amostra usada na extração relativamente à unidade de medição exigida;

Ep é a eficiência do procedimento, extração e amplificação, **expressa em decimais**;

Ve é o volume total do produto de extração **expresso em µL**;

Va é o volume do produto de extração usado na reação de amplificação **expresso em µL**;

Quantidade é o resultado da reação de amplificação da amostra **expressa em gEq por reação**.

Quando é usado o sistema de extração **NucliSENS® easyMAG®** com amostras de sangue total colhidas em EDTA e é necessário o resultado **em gEq / mL**, a fórmula passa a ser:

Table 37

Fórmula simplificada para sangue total e NucliSENS® easyMAG®
$Nc \text{ (gEq/mL)} = 100 \times \text{Quantidade}$

Quando é usado o sistema de extração **NucliSENS® easyMAG®** com amostras de líquido cefalorraquidiano colhidas em EDTA e é necessário o resultado **em gEq / mL**, a fórmula passa a ser:

Table 38

Fórmula simplificada para líquido cefalorraquidiano e NucliSENS® easyMAG®
$Nc \text{ (gEq/mL)} = 20 \times \text{Quantidade}$

Quando é usado o sistema de extração **QIASymphony® SP/AS** com amostras de líquido cefalorraquidiano colhidas em EDTA e é necessário o resultado **expresso em gEq / mL**, a fórmula passa a ser:

Table 39

Fórmula simplificada para sangue total e QIASymphony® SP/AS
$Nc \text{ (gEq/mL)} = 45 \times \text{Quantidade}$

13.5 Cálculo dos limites do intervalo de medição linear

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

Table 40

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

Table 41

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

Quando é usado o sistema de extração **NucliSENS® easyMAG®** com amostras de sangue total colhidas em EDTA, a fórmula passa a ser:

Table 42

Limites do intervalo de medição linear (gEq / mL) com NucliSENS® easyMAG®
Limite inferior (gEq/mL) = 100 x 10 gEq Limite superior (gEq/mL) = 100 x 1.000.000 gEq
de 1000 a 100.000.000 gEq/mL

Quando é usado o sistema de extração **NucliSENS® easyMAG®** com amostras de líquido cefalorraquidiano colhidas em EDTA, a fórmula passa a ser:

Table 43

Limites do intervalo de medição linear (gEq / mL) com NucliSENS® easyMAG®
<p>Limite inferior (gEq/mL) = 20 x 10 gEq Limite superior (gEq/mL) = 20 x 1.000.000 gEq</p>
de 200 a 20.000.000 gEq/mL

Quando é usado o sistema de extração **QIASymphony® SP/AS** com amostras de sangue total colhidas em EDTA, a fórmula passa a ser:

Table 44

Limites do intervalo de medição linear (gEq / mL) com QIASymphony® SP/AS
<p>Limite inferior (gEq/mL) = 45 x 10 gEq Limite superior (gEq/mL) = 45 x 1.000.000 gEq</p>
de 450 a 45.000.000 gEq/mL

14 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM OUTROS SISTEMAS

14.1 Sensibilidade analítica: limite de deteção

A sensibilidade analítica deste ensaio permite a deteção da presença de cerca de 10 moléculas de ADN alvo em 10 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A sensibilidade analítica deste ensaio, como limite de deteção, foi testado usando o ADN plasmídico que contém o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. O ADN plasmídico foi diluído a um título de 10 cópias/10 µL com IC-ADN, diluído a um título de 20.000 cópias/10 µL, no ADN genómico humano a um título de 500 ng/10 µL. Esta amostra foi testada em 50 réplicas, efetuando a amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Table 45

Amostras	Nº	positivo	negativo
10 cópias de ADN plasmídico + 20.000 cópias de IC-ADN + 500 ng de ADN genómico humano	50	50	0

14.2 Sensibilidade analítica: intervalo de medição linear

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

A sensibilidade analítica deste ensaio foi determinada usando um painel de diluições (passos de diluição de 1 log10) de ADN de plasmídeo contendo o produto de amplificação, cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. As diluições de 10⁷ moléculas por reação a 10¹ moléculas por reação foram testadas em 9 réplicas através da realização da amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

A análise dos dados obtidos, realizada por regressão linear, demonstrou que o ensaio mostra uma resposta linear para todas as diluições (coeficiente de correlação quadrado superior a 0,99).

O limite superior do intervalo de medição linear foi definido a 10⁶ moléculas por reação, o que corresponde ao equivalente genómico por reação, dentro de 1 algoritmo da concentração mais alta do standard de amplificação Q - PCR Standard (10⁵ moléculas/10 µL).

O limite inferior do intervalo de medição linear foi definido a 10 moléculas por reação, o que corresponde ao equivalente de genoma por reação, dentro de 1 algoritmo desde a concentração mais baixa do standard de amplificação Q - PCR Standard (10^2 moléculas/10 μ L).

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Table 46

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

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

14.3 Sensibilidade analítica: Precisão e exatidão

A precisão do ensaio, enquanto variabilidade dos resultados obtidos com várias réplicas de uma amostra testada dentro da mesma sessão, permitiu obter uma percentagem média do Coeficiente de variação (% CV) de cerca de 25,9% das quantidades medidas, dentro do intervalo de 10^6 moléculas a 10^1 moléculas nos 10 μ L de ADN adicionado à reação de amplificação.

A precisão do ensaio, enquanto diferença entre a média dos resultados obtidos com várias réplicas de uma amostra testada dentro da mesma sessão e a concentração teórica da amostra, permitiu obter uma percentagem média de Imprecisão (% Imprec.) de cerca de 9,0% das quantidades medidas, dentro do intervalo de 10^6 moléculas a 10 moléculas nos 10 μ L de ADN adicionado à reação de amplificação.

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

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

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

A análise das regiões escolhidas para a hibridização dos primários e da sonda fluorescente no alinhamento das sequências disponíveis na base de dados para o gene **U57** do HHV7, revelou a respetiva conservação e ausência de mutações significativas.

14.5 Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi testada através da análise de algumas amostras clínicas positivas de ADN de HHV7.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 23 amostras de sangue total colhidas em EDTA (testadas com produto de amplificação agrupado CE IVD) que foram reforçadas em título igual a três vezes o limite de deteção para ADN de HHV7 com a amostra de referência certificada "HHV7 Culture Fluid", (Ref. 0810071CF, ZeptoMetrix, USA). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 47

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA reforçado para ADN de HHV7	23	23	0

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

A sensibilidade do diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 25 amostras de líquido cefalorraquidiano negativas para o ADN do HHV7 (testadas com um produto de amplificação CE IVD nested) que foram adicionadas a um título igual a três vezes o limite de detecção do ADN do HHV7 com a amostra de referência certificada "HHV7 Culture Fluid", (Ref. 0810071CF, ZeptoMetrix, EUA). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração, com o sistema automático NucliSENS® easyMAG® e amplificação, com o ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 48

Amostras	N	positivo	negativo
Líquido cefalorraquidiano reforçado para ADN de HHV7	25	25	0

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

14.6 Especificidade analítica: ausência de reatividade cruzada com marcadores potencialmente interferentes

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

A análise do alinhamento das sequências dos primários e da sonda fluorescente com as sequências disponíveis nas bases de dados para organismos diferentes do HHV7, incluindo o genoma completo de CMV, EBV, HHV6, os vírus humanos mais semelhantes ao HHV7, revelou a respetiva especificidade e a ausência de homologia significativa.

A especificidade analítica do ensaio, como ausência de reatividade cruzada com outros marcadores potencialmente interferentes, foi verificada utilizando algumas amostras clínicas negativas para ADN de HHV7 e positivas para outros agentes patogénicos.

A especificidade analítica foi verificada utilizando como material de referência 12 amostras de sangue total colhidas em EDTA, negativas para o ADN do HHV7 (testado com um produto de amplificação CE IVD nested), mas positivas para o ADN de outros agentes patogénicos (CMV, EBV e HHV6). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração e amplificação, com os produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 49

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA, positivo para CMV	4	0	4
Sangue total colhido em EDTA, positivo para EBV	6	0	6
Sangue total colhido em EDTA, positivo para HHV6	1	0	1
Sangue total colhido em EDTA, positivo para HHV6 e EBV	1	0	1

14.7 Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade diagnóstica do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi testada através da análise de algumas amostras clínicas negativas de ADN de HHV7.

A especificidade diagnóstica foi avaliada utilizando como material de referência 23 amostras de sangue total colhidas em EDTA negativas para o ADN do HHV7 (testado com um produto de amplificação CE IVD nested). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração e amplificação, com os produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 50

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA negativo para ADN de HHV7	23	0	23

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

A especificidade diagnóstica foi avaliada utilizando como material de referência 26 amostras de líquido cefalorraquidiano negativas para o ADN do HHV7 (testado com um produto de amplificação CE IVD nested). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração, com o sistema automático NucliSENS® easyMAG® e amplificação, com o ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 51

Amostras	N	positivo	negativo
Líquido cefalorraquidiano negativo para ADN de HHV7	26	1	25

Uma amostra deu um resultado positivo discordante para o ADN do HHV7, com um título inferior a 1 cópia/reação. A discrepância pode ser explicada se se considerar que amostras com títulos tão baixos podem dar resultados positivos e negativos de forma alternada e aleatória.

A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi de 96,1%.

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 "HHV7 ELITe MGB Kit®Kit", FTP RTS037PLD.

15 REFERÊNCIAS

F. Drago et al. (1997) Lancet 349: 1367 - 1368 (allegato n° 1, 2 pagine);

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

Michael Kidd et al. (1996) The Journal of Infectious Diseases 174: 396-401

16 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

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

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

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

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

Não use ADN extraído que esteja contaminado com hemoglobina, dextran, Ficoll®, etanol ou 2-propanol com este produto: estas substâncias inibem a reação de amplificação dos ácidos nucleicos e pode causar resultados inválidos.

Não use com este produto ADN extraído contendo uma elevada quantidade de ADN genómico humano que possa inibir a reação de amplificação de ácidos nucleicos.

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

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

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

Os resultados obtidos com este produto podem, por vezes, ser inválidos devido a uma falha do Internal Control. 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 52

Reação do Q-PCR Standard, curva standard ou reação do Controlo Positivo inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição de PCR Mix, Q-PCR Standards e Positive Control. Verifique os volumes de PCR Mix, Q-PCR Standards e Positive Control.
Degradação da PCR Mix.	Não use a 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 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 PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos. Utilize uma nova alíquota da 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 Controlo positivo (Positive Control).
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 53

Reação de Negative Control inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da PCR Mix e do Negative Control. Verifique os volumes da 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 do PCR Mix.	Utilize uma nova alíquota da 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 54

Reação da amostra inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da PCR Mix, do Internal Control e da amostra. Verifique os volumes de PCR Mix, Internal Control e da amostra.
Degradação da PCR Mix.	Não use a PCR Mix para mais de 5 sessões independentes (3 horas cada na Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit). Não utilize a 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 PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos. Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Degradação do modelo de Internal Control.	Utilize uma nova alíquota da Internal Control.
Inibição devido a substâncias interferentes na amostra.	Repita a amplificação com uma diluição de 1:2 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR only". Repita a extração com uma diluição 1:2 em água de grau de biologia molecular da amostra numa sessão "Extract + PCR" (Extrair+ PCR).
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 55

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

Table 56

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

Table 57

Elevada taxa anómala de resultados positivos na mesma sessão (reações com valores Ct recentes semelhantes)	
Causas possíveis	Soluções
Contaminação entre amostras durante os passos pré-analíticos.	<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>Introduzir 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 da PCR Mix e/ou CPE.</p>

Plataforma aberta:**Table 58**

ADN alvo não detetado nas reações de Positive Control ou Q - PCR Standard ou coeficiente de correlação inválido da Curva standard	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	<p>Tenha cuidado quando distribuir reações para os furos da microplaca e cumpra a ficha de trabalho.</p> <p>Verifique os volumes da mistura de reação distribuída.</p> <p>Verifique os volumes do controlo positivo ou standard distribuído.</p>
Degradação da sonda.	Use uma nova alíquota da mistura de reação.
Degradação do Positive Control ou do standard.	Utilize uma nova alíquota de Positive Control ou standard.
Erro na configuração do instrumento.	<p>Verifique as definições de posição para as reações de controlo positivo ou standard no instrumento.</p> <p>Verifique as definições do ciclo térmico no instrumento.</p>

Table 59

ADN do alvo detetado na reação de Negative Control	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	<p>Evite derramar o conteúdo do tubo de teste da amostra.</p> <p>Mude sempre as pontas entre uma amostra e a outra.</p> <p>Tenha cuidado quando distribuir amostras, Negative Controls, positive controls ou standards para os furos da microplaca e cumpra a ficha de trabalho.</p>
Erro durante a definição do instrumento	Verifique as definições de posição das amostras, dos Negative Controls, dos Positive Controls e dos standards no instrumento
Microplaca mal vedada.	Tenha cuidado quando vedar a microplaca.
Contaminação da água de qualidade para biologia molecular.	Use uma nova alíquota de água esterilizada.

Table 59 (continued)

ADN do alvo detetado na reação de Negative Control	
Causas possíveis	Soluções
Contaminação da mistura de reação.	Use uma nova alíquota da mistura de reação.
Contaminação da área de extração/preparação para reações de amplificação.	Limpe as superfícies e instrumentos com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos de ensaio e as pontas em utilização.

Table 60

Fluorescência de fundo irregular ou elevada nas reações	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta da amostra.	Tenha cuidado, ao pipetar três vezes, quando misturar amostras, Negative Controls e Positive Controls ou standards na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.
Erro na configuração da linha de base.	Defina o intervalo de cálculo da linha de base dentro dos ciclos onde a fluorescência de fundo já estabilizou (verifique os dados "Resultados", "Componente") e a fluorescência do sinal ainda não tenha começado a aumentar, por ex. do ciclo 6 para o ciclo 15. Utilize o cálculo automático da linha de base configurando a opção "Linha de base auto".

Table 61

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

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



Identificação única do dispositivo



Contém suficiente para "N" testes.



Consultar as instruções de utilização.



Conteúdo.



Manter afastado da luz solar.



Fabricante.

19 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 7319022, 7348146, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8163910, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, e os números de patente EP 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 bem como pedidos que estejam atualmente pendentes.

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 HHV7 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 **HHV7 ELITE MGB® Kit** é um ensaio qualitativo e quantitativo da amplificação de ácidos nucleicos para a **deteção e quantificação do ADN do vírus humano herpes 7 (HHV7)** em amostras de ADN extraídas de sangue total colhido em EDTA e plasma colhido em EDTA e líquido cefalorraquidiano (LCR).

O ensaio é validado em associação com os instrumentos ELITE InGenius® e ELITE BeGenius®, automatizados e integrados para extração, PCR em tempo real e interpretação de resultados, utilizando amostras humanas de sangue total e plasma colhidas em EDTA.

O ensaio está validado em associação com o **7300 Real-Time PCR System** e o **7500 Real-Time PCR System**, usando amostras humanas de sangue total, plasma colhido em EDTA e líquido cefalorraquidiano.

O produto destina-se para utilização no diagnóstico e monitorização de infeções de HHV7, junto com dados clínicos do doente e outros resultados de teste de laboratório.


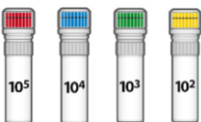

Sequência amplificada

Sequência	Gene	Fluoróforo	Canal
Alvo	gene da proteína do capsídeo U57	FAM	HHV7
Internal Control	IC2	AP525 (VIC)	IC

Matriz validada

- Sangue total colhido em EDTA
- Plasma colhido em EDTA

Conteúdo do Kit e produtos relacionados

HHV7 ELITE MGB Kit	HHV7 ELITE Standard	HHV7 - ELITE Positive Control
 X 4	 X 2	 X 1
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 cópias/rxn, 10 ⁴ cópias/rxn, 10 ³ cópias/rxn, 10 ² cópias/rxn. 2 conjuntos de 4 tubos de 160 µL 4 ciclos de congelação-descongelação (4 sessão separadas no bloco)	Ready-to-use PC 1 tubo de 160 µL 4 reações por kit 4 ciclos de congelação-descongelação (4 sessão separadas no bloco)

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. 	<ul style="list-style-type: none"> CPE - Internal Control: CTCPE Consumíveis do ELITE InGenius e ELITE BeGenius (ver instruções de utilização do ELITE InGenius e do ELITE BeGenius)
---	--

Protocolo do ELITE InGenius e do ELITE BeGenius

Table 62

<ul style="list-style-type: none"> Volume de entrada da extração Volume CPE Volume de eluição da extração Volume de entrada de PCR da amostra 	200 µL 10 µL 100 µL 10 µL	<ul style="list-style-type: none"> Volume de PCR Mix Frequência dos controlos Frequência da calibração Unidade do resultado quantitativo 	20 µL 15 dias 60 dias cópias/mL
---	------------------------------------	--	--

Desempenhos ELITE InGenius e ELITE BeGenius

Matriz	Limite de deteção	Sensibilidade de diagnóstico	Especificidade do diagnóstico
	cópias/mL		
sangue total	500	100% (34/34)*	100% (38/38)*
plasma	500	100% (33/33)*	100% (33/33)*

*amostras confirmadas/amostras testadas

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.

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	≤ 24 horas	≤ 72 horas	≤ 1 mês	> 1 mês
Plasma	EDTA	≤ 24 horas	≤ 72 horas	≤ 1 mês	> 1 mês

EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético

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 calibradores: Q-PCR Standard no menu “Calibration” (Calibração) Verifique os controlos: Positive Control e Negative Control no menu “Controls” (Controlos) Nota: Todos devem ter sido executados, aprovados e não ter expirado.</p>	<p>3. Descongele os tubos PCR Mix e CTCRPE 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: HHV7 ELITE_WB_200_100 ou HHV7 ELITE_PL_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)

<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: HHV7 ELITE_PC e HHV7 ELITE_NC ou HHV7 ELITE_STD ou HHV7 ELITE_WB_200_100 ou HHV7 ELITE_PL_200_100</p>	<p>5. Selecione o método “PCR Only” (Apenas PCR) e a posição da amostra “Elution Tube” (Tubo de eluição)</p>	<p>6. Carregue a PCR Mix no Inventory Block (Gestor do reagente)</p>
<p>7. Carregar: Rack de PCR Cassette e suporte de Elution tube (Tubo de eluição) com o ácido nucleico extraído</p>	<p>8. Feche a porta. Iniciar a execução</p>	<p>9. Visualize, aprove e guarde os resultados</p>

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

<p>1. Ligue o ELITE BeGenius. Inicie sessão com o nome de utilizador e a palavra-passe. Selecione o modo “Closed” (Fechado)</p>	<p>2. Verifique os calibradores: Q-PCR Standard no menu “Calibration” (Calibração) Verifique os controlos: Positive Control e Negative Control no menu “Controls” (Controlos) Nota: Todos devem ter sido executados, aprovados e não ter expirado.</p>	<p>3. Descongele os tubos PCR Mix e CTCRPE 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 e, a seguir, clique no modo de execução “Extract + PCR” (Extrair +PCR)</p>	<p>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</p>	<p>3. Verifique os volumes de extração: Entrada: “200 µL”, eluato: “100 µL”</p>
<p>4. Selecione o “Assay protocol” (Protocolo de ensaio) de interesse HHV7 ELITE_Be_WB_200_100 ou HHV7 ELITE_Be_PL_200_100r Nota: Se for realizada uma segunda extração, repita os passos 2 a 4</p>	<p>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</p>	<p>6. Carregue a PCR Mix e o Internal Control no rack de reagente/eluição e insira-o na Cooler Unit</p>
<p>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</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)

<p>1. Selecione “Perform Run” (Executar) no ecrã tátil e, a seguir, clique no modo de execução “PCR Only” (Apenas PCR)</p>	<p>2. Carregue os tubos com código de barras do ácido nucleico extraído ou dos controlos no rack de eluição e insira-o na Cooler Unit.</p>	<p>3. Para Standards e Controlos: 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 validade) e o “T/R” (número de reações). Para os eluatos: 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).</p>
<p>4. Selecione o “Assay protocol” (Protocolo de ensaio) de interesse: HHV7 ELITE_Be_PC e HHV7 ELITE_Be_NC, ou HHV7 ELITE_Be_STD ou HHV7 ELITE_Be_WB_200_100 ou HHV7 ELITE_Be_PL_200_100</p>	<p>5. Carregue a mistura de reação completa no “Reagent/Elution Rack” (Rack de reagente/eluição) e insira-o na Cooler Unit.</p>	<p>6. Carregue o “PCR Rack” com “PCR Cassette”.</p>
<p>7. Feche a porta. Iniciar a execução.</p>	<p>8. Visualize, aprove e guarde os resultados.</p>	

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

