




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

NOTICE of CHANGE dated 03/06/2024

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«PVB19 ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTS070PLD

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

- Update for the use of the product in association with «ELITe BeGenius[®]» instrument (REF INT040) and amniotic fluid matrix.

Update of PERFORMANCE CHARACTERISTICS (pag.16):

- Linear measuring range
- Conversion factor to International Units
- Addition of UDI information.

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE

	LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT
	THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT
	CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT
	LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT
	A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT
	DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT



Parvovirus B19 ELITE MGB® Kit

reagentes para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD



UDI 08033891483623

ÍNDICE

UTILIZAÇÃO PREVISTA	página 1
PRINCÍPIOS DO ENSAIO	página 2
DESCRIÇÃO DO PRODUTO	página 2
MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO	página 2
MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO	página 2
OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS	página 3
AVISOS E PRECAUÇÕES	página 4
AMOSTRAS E CONTROLOS PARA O ELITE InGenius e o ELITE BeGenius	página 5
PROCEDIMENTO DO ELITE InGenius	página 7
PROCEDIMENTO DO ELITE BeGenius	página 13
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITE InGenius e ELITE BeGenius	página 18
AMOSTRAS E CONTROLOS PARA OUTROS SISTEMAS	página 24
PROCEDIMENTOS DE OUTROS SISTEMAS	página 26
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM OUTROS SISTEMAS	página 35
REFERÊNCIAS	página 42
LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	página 42
RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	página 44
SÍMBOLOS	página 47
NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	página 48
ANEXO: GUIA DE INICIAÇÃO RÁPIDA	página A

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O **Parvovirus B19 ELITE MGB® Kit** é um dispositivo médico de diagnóstico in vitro que se destina a ser usado por profissionais de saúde como um ensaio de PCR em tempo real de ácidos nucleicos qualitativo e quantitativo para a **deteção e quantificação de ADN do vírus humano Parvovirus B19 (PVB19)**, genótipos 1, 2, 3a e 3b, em amostras de ADN extraídas de amostras clínicas.

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

O ensaio foi também validado em associação com o **7300 Real-Time PCR System** e o **7500 Real-Time PCR Instrument**, usando amostras humanas de sangue total (periférico e da medula óssea) colhido em EDTA e plasma colhido em EDTA.

Parvovirus B19 ELITE MGB® Kit

reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

Este produto destina-se a ser utilizado como um auxílio no diagnóstico e na monitorização de infeções por Parvovirus B19. Os resultados devem ser interpretados em conjunto com todas as observações clínicas e resultados laboratoriais relevantes.

PRINCÍPIOS DO ENSAIO

O ensaio é uma PCR em tempo real quantitativa que deteta ADN de Parvovirus, isolado de amostras e amplificado usando o reagente de ensaio **PVB19 Q PCR Mix**, que contém primers e sondas com tecnologia ELITE MGB.

As sondas ELITE MGB são ativadas quando hibridizam com os produtos da PCR correspondentes. O **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 **PVB19** 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.

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O **Parvovirus B19 ELITE MGB Kit** fornece o reagente do ensaio **PVB19 Q PCR Mix**, uma mistura de PCR otimizada e estabilizada que contém os primers e sondas específicos de:

- PVB19 região **VP1**, detetado no Canal **PVB19**; a sonda é estabilizada por MGB, inativada pelo Eclipse Dark Quencher® e identificada com corante FAM.

- Controlo Interno (IC), específico para o **promotor e a região 5' UTR** do gene da **betaglobulina humana**, detetado no Canal **IC**; a sonda é estabilizada pelo MGB, inativada pelo Eclipse Dark Quencher® e identificada pelo corante AquaPhluor® 525 (AP525).

A **PVB19 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 **Parvovirus B19 ELITE MGB Kit** contém reagentes suficientes para **96 testes no ELITE InGenius** e no **ELITE BeGenius (24 testes em cada tubo)** e para **100 testes noutros sistemas (25 testes em cada tubo)**, com 20 µL usados por reação.

O **Parvovirus B19 ELITE MGB Kit** pode também ser usado em associação com instrumentos equivalentes.

MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
PVB19 Q - PCR Mix ref. RTS070PLD	Mistura de reagentes para o tubo de PCR em tempo real com tampa transparente	4 x 540 µL	-

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- Câmara de fluxo laminar.
- Luvas de nitrilo sem pó descartáveis ou material semelhante.
- Misturador de vórtice.
- Microcentrifuga de bancada (~13.000 RPM).
- Micropipetas e pontas estéreis com filtro de aerossol ou pontas de deslocação positiva estéreis (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

- Tubos com tampa de parafuso esterilizados de 2,0 mL (Sarstedt, Alemanha, ref. 72.694.005).
- Água de grau de biologia molecular.
- Termóstato programável com sistema ótico de deteção de fluorescência 7300 Real Time PCR System ou 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument calibrado de acordo com as instruções do fabricante.

OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

Os reagentes para extração do ADN de amostra, o controlo interno da extração e inibição, o positivo 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:

Instrumentos e software	Produtos e reagentes
<p>ELiTe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA ref. INT030)</p> <p>ELiTe InGenius Software versão 1.3.0.17 (ou superior)</p> <p>PVB19 ELiTe_STD, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para a análise dos Calibradores.</p> <p>PVB19 ELiTe_PC, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para análise do Positive Control</p> <p>PVB19 ELiTe_NC, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para análise do Negative Control</p> <p>PVB19 ELiTe_WB_200_100, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para análise de amostra do sangue total</p> <p>PVB19 ELiTe_AF_200_100, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para análise de amostra do líquido amniótico.</p>	<p>ELiTe InGenius SP200 (EG SpA, ref. INT032SP200)</p> <p>ELiTe InGenius SP 200 Consumable Set (EG SpA, ref. INT032CS)</p> <p>ELiTe InGenius PCR Cassette (EG SpA, ref. INT035PCR),</p> <p>ELiTe InGenius Waste Box (EG SpA, ref. F2102-000)</p> <p>300 µL Filter Tips Axygen (Corning Life Sciences Inc., ref. TF-350-L-R-S) apenas com o ELiTe InGenius</p> <p>1000 µL Filter Tips Tecan (Tecan, Switzerland, ref. 30180118) com o ELiTe BeGenius apenas</p> <p>CPE – Internal Control (EG SpA, ref. CTRCPE)</p> <p>Parvovirus B19 ELiTe Standard (EG SpA, ref. STD070PLD)</p> <p>Parvovirus B19 – ELiTe Positive Control (EG SpA, ref. CTR070PLD)</p>
<p>ELiTe BeGenius (EG SpA ref. INT040)</p> <p>ELiTe BeGenius Software versão 2.1.0. (ou superior)</p> <p>PVB19 ELiTe_Be_STD, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para análise de Calibradores</p> <p>PVB19 ELiTe_Be_PC, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para análise do Positive Control.</p> <p>PVB19 ELiTe_Be_NC, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para análise do Negative Control</p> <p>PVB19 ELiTe_Be_WB_200_100, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para análise de amostra do sangue total</p> <p>PVB19 ELiTe_Be_AF_200_100, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para análise de amostra do líquido amniótico.</p>	<p>MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (LifeTechnologies, ref. N8010560)</p> <p>CPE – Internal Control (ELITechGroup S.p.A., ref. CTRCPE)</p> <p>Parvovirus B19 ELiTe Standard (EG SpA, ref. STD070PLD)</p> <p>Parvovirus B19 – ELiTe Positive Control (EG SpA, ref. CTR070PLD)</p> <p>QIASymphony® Midi kit (QIAGEN GmbH, Ref. 931236)</p> <p>NucliSENS® easyMAG® Reagents (bioMérieux SA, Ref. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135),</p> <p>ELiTe GALAXY 300 Extraction Kit (EG S.p.A., ref. INT021EX)</p> <p>InviMag Universal Kit / IG (INVITEK, ref. 2450120100).</p>
<p>7300 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, ref. 4351101)</p> <p>QIASymphony® SP/AS (QIAGEN GmbH, Ref. 9001297, 9001301)</p> <p>NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux SA, Ref. 200111)</p> <p>ELiTe GALAXY (EG S.p.A., ref. INT020)</p> <p>ELiTe STAR (EG SpA ref. INT010)</p>	

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

Instrumentos e software	Produtos e reagentes
<p>7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, ref. 4406985)</p> <p>QIASymphony® SP/AS (QIAGEN GmbH, Ref. 9001297, 9001301)</p> <p>NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux SA, Ref. 200111)</p> <p>ELiTe GALAXY (EG S.p.A., ref. INT020)</p> <p>ELiTe STAR (EG SpA ref. INT010)</p>	<p>«MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate» with Barcode, 0.1 mL (Life Technologies, ref. 4346906)</p> <p>CPE – Internal Control (ELITechGroup S.p.A., ref. CTRCPE)</p> <p>Parvovirus B19 ELiTe Standard (EG SpA, ref. STD070PLD)</p> <p>Parvovirus B19 – ELiTe Positive Control (EG SpA, ref. CTR070PLD)</p> <p>QIASymphony® Midi kit (QIAGEN GmbH, Ref. 931236)</p> <p>NucliSENS® easyMAG® Reagents (bioMérieux SA, Ref. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135),</p> <p>ELiTe GALAXY 300 Extraction Kit (EG S.p.A., ref. INT021EX)</p> <p>InviMag Universal Kit / IG (INVITEK, ref. 2450120100).</p>

Um fator de conversão (Fc) permite exprimir os resultados da análise quantitativa em Unidades Internacionais (IU) do PVB19 da "3.ª Norma Internacional da OMS para ADN de Parvovirus B19 para técnicas de amplificação de ácido nucleico (NAT)" (NIBSC ref. 12/208, Reino Unido).

AVISOS E PRECAUÇÕES

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

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

Manuseie e elimine todos os reagentes e todos os materiais usados na realização do ensaio como se fossem infecciosos. Evite o contacto direto com os reagentes. Evite salpicos ou vaporizações. Os resíduos devem ser manuseados e eliminados em conformidade com as normas de segurança adequadas. Os materiais combustíveis descartáveis devem ser incinerados. Os resíduos líquidos que contenham ácidos ou bases devem ser neutralizados antes da eliminação. Não permita que os reagentes de extração entrem em contacto com hipoclorito de sódio (lixívia).

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

Nunca deve pipetar soluções com a boca.

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

Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.

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

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

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

Não utilize o produto após a data de validade indicada.

Use apenas os reagentes fornecidos com o produto e os recomendados pelo fabricante.

Não use reagentes de lotes diferentes.

Não use reagentes de outros fabricantes.

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.

Parvovirus B19 ELITE MGB® Kit
reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

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

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

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

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

Avisos e precauções específicos para os componentes

Componente	Temperatura de armazenamento	Utilização a partir da primeira abertura	Ciclos de congelação/descongelação	Estabilidade de bordo (ELITE InGenius e ELITE BeGenius)
PVB19 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

AMOSTRAS E CONTROLOS para o ELITE InGenius e ELITE BeGenius

Amostras

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

Amostra	Requisitos de colheita	Condições de transporte/armazenamento			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2 / +8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Sangue Total	EDTA	≤ 24 horas	≤ 3 dias	≤ 30 dias	≤ 30 dias
Líquido amniótico	colhidas sem conservantes	≤ 4 horas	≤ 4 horas	≤ 30 dias	≤ 30 dias

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 **ELITE BeGenius**, devem ser usados os seguintes Protocolos de Ensaio (Assay Protocols). Estes protocolos de DIV foram especificamente validados com os **ELITE InGenius** ou **ELITE BeGenius** com as matrizes indicadas.

Parvovirus B19 ELITE MGB® Kit
reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

Protocolos de ensaio para o Parvovirus B19 ELITE MGB Kit					
Amostra	Instrumento	Transferência de amostra	Nome do Assay Protocol (Protocolo de ensaio)	Relatório	Características
Sangue total	ELITE InGenius	Não necessário	PVB19 ELITE_WB_200_100	cópias / mL ou IU / mL	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição do extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
	ELITE BeGenius	Não necessário	PVB19 ELITE_Be_WB_200_100	cópias / mL ou IU / mL	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição do extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
Líquido amniótico	ELITE InGenius	necessário, no Extraction Tube (Tubo de extração)	PVB19 ELITE_AF_200_100	cópias / mL ou IU / mL	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição do extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
	ELITE BeGenius	necessário, no tubo Sarstedt de 2 mL	PVB19 ELITE_Be_AF_200_100	cópias / mL ou IU / mL	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição do extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

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

Nota: 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".

Nota: O volume da amostra num tubo primário varia consoante o tipo de tubo carregado. Consulte as instruções de utilização do kit de extração ou o manual do **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** para obter mais informações sobre como preparar e realizar o procedimento de extração.

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.

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, use os quatro níveis do produto **Parvovirus B19 ELiTe Standard** (não fornecido com este kit) com os protocolos de ensaio **PVB19 ELiTe_STD** ou **PVB19 ELiTe_Be_STD**.

Nota: as concentrações de Q – PCR Standard são expressas em cópias/reacção (10⁵ cópias/rxn, 10⁴ cópias/rxn, 10³ cópias/rxn, 10² cópias/rxn).

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

- Para o Positive Control, use o produto **Parvovirus B19 - ELiTe Positive Control** (não fornecido com este kit) com os protocolos de ensaio **PVB19 ELiTe_PC** ou **PVB19 ELiTe_Be_PC**,
- Para o Negative Control, utilize água de grau biológico molecular (não fornecida com este kit) com os Protocolos de Ensaio **PVB19 ELiTe_NC** ou **PVB19 ELiTe_Be_NC**.

Nota: O **ELiTe InGenius** e **ELiTe BeGenius** permitem a geração e o armazenamento da curva de calibração e a validação do controlo de PCR para cada lote de reagente de PCR.

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

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

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

- 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 no **ELiTe InGenius** ou **ELiTe BeGenius**.

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.

PROCEDIMENTO ELiTe InGenius

O procedimento de utilização do **Parvovirus B19 ELiTe MGB Kit** com o **ELiTe InGenius** consiste em três passos:

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

PASSO 1 – Verificação da disponibilidade do sistema

Antes de iniciar a sessão:

- ligue o **ELiTe InGenius** e inicie sessão no modo “**CLOSED**”,
- no menu “Calibração” na página inicial, verifique se os Calibradores (**PVB19 Q - PCR Standard**) estão aprovados e válidos (Estado) para o lote DE **PVB19 PCR Mix** a ser utilizada. Caso não haja calibradores válidos para o lote de **PVB19 PCR Mix**, realize a calibração conforme descrito nas secções seguintes,
- no menu “Controlos” da página inicial, verifique se os controlos de PCR (**PVB19 - Positive Control**, **PVB19 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 **PVB19 PCR Mix** execute os controlos de PCR conforme descrito nas secções seguintes,
- escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela EG SpA (consulte “Amostras e Controlos”).

Se o Assay Protocol (Protocolo de 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.

PASSO 2 – Configuração da sessão

O **Parvovirus B19 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 da calibração (PCR only [Apenas PCR]),
- Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [Apenas PCR]).

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

Nota: 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 da **PVB19 Q 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.

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

Parvovirus B19 ELITE MGB® Kit
reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

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" (Página inicial).	Selecione " Perform Run " (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial).
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 Rastreamento e introduza a "SampleID" (SID) digitando ou lendo o código de barras da amostra.	Para cada amostra, atribua um Rastreamento 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.
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).

Parvovirus B19 ELITE MGB® Kit
reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

	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. Prepare o Negative Control , transfira pelo menos 50 µL de água de qualidade para biologia molecular para um "Elution tube" (Tubo de eluição), fornecido com o ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial).	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial).
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) 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.	Carregue a PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) consultando 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.
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.

Nota: 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.

Nota: No final da operação, a **PCR Mix** pode ser retirada do instrumento, tapada e armazenada a -20 °C ou menos 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.

Nota: 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.

Nota: O **PVB19 Q-PCR Standard** pode ser usado para 4 sessões separadas de 2 horas cada.

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

Nota: O **PVB19 Positive Control** pode ser usado para 4 sessões separadas de 3 horas cada.

Nota: 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.

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.

Nota: 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 utilizando o **PVB19 ELiTe MGB Kit** através do seguinte procedimento:

- Validação da Curva de calibração,
- Validação dos resultados do Controlo Positivo e Controlo Negativo,
- Validação dos resultados da amostra,
- Elaboração do relatório do resultado da amostra.

A. Validação da Curva de calibração

O **ELiTe InGenius software** interpreta os resultados do PCR para o alvo das reações do Calibrador com os parâmetros do Assay Protocol (Protocolo de ensaio) **PVB19 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**.

Nota: Se a curva de calibração não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem "Failed" no ecrã "Calibration". Neste caso, os resultados não podem ser aprovados e têm de ser repetidas as reações de amplificação do Calibrador. 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.

B. Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação

O software **ELiTe InGenius** interpreta os resultados da PCR para os alvos das reações de Positive Control e Negative Control com os parâmetros dos protocolos de ensaio **PVB19 ELiTe_PC** e **PVB19 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 do reagente de PCR, são registados na base de dados (Controlos) e 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**.

O software **ELiTe InGenius** processa os resultados do positive control e do negative control e gera os Gráficos de Controlo. São usados quatro resultados de Controlo Positivo e do Controlo Negativo aprovados para preparar o "Gráfico de controlo" inicial. Para controlos 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.

Nota: 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.

Nota: 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) falhado e as amostras têm de ser todos repetidos.

C. Validação dos resultados da amostra

O **ELiTe InGenius software** interpreta os resultados de PCR para o alvo (Canal **PVB19**) e do Controlo Interno (Canal **IC**) com os parâmetros do Assay Protocol (Protocolo de ensaio) **PVB19 ELiTe_WB_200_100** e **PVB19 ELiTe_AF_200_100**. Os valores de Ct do alvo resultante são convertidos em concentração.

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

Os resultados da amostra podem ser aprovados quando forem cumpridas as três condições reportadas na tabela abaixo.

1) Curva de calibração	Estado
PVB19 Q-PCR Standard	APROVADO
2) Positive Control	Estado
PVB19 Positive Control	APROVADO
3) Negative Control	Estado
PVB19 Negative Control	APROVADO

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

Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado.

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

Resultado da execução da amostra	Interpretação
PVB19: DNA Detected, quantity equal to XXX copies / mL or IU / mL (PVB19:DNA detetado, quantidade igual a "XXX" cópias/mL)	Foi detetado ADN de PVB19 na amostra no intervalo de medição de ensaio, a sua concentração é mostrada.
PVB19: DNA Detected, quantity below LLoQ copies / mL or IU / mL (PVB19:DNA detetado, quantidade abaixo "LLoQ" cópias/mL)	Foi detetado ADN de PVB19 na amostra, a sua concentração é inferior ao ensaio - limite inferior de quantificação
PVB19: DNA Detected, quantity beyond ULoQ copies / mL or IU / mL (PVB19:DNA detetado, quantidade além de "ULoQ" cópias/mL)	Foi detetado ADN de PVB19 na amostra, a sua concentração é superior ao ensaio - limite superior de quantificação
PVB19: DNA Not detected or below LoD copies / mL or IU / mL (PVB19:DNA não detetado ou abaixo de "LoD" cópias/mL)	Não foi detetado ADN de PVB19 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 Controlo Interno (extração incorreta, transferência de inibidores). O teste deve ser repetido.

Amostras indicadas como "Invalid - Retest Sample" (Inválido - testar novamente amostra): caso, o ARN do Controlo Interno não foi detetado eficientemente devido a problemas nos passos de colheita, extração ou PCR da amostra (por ex. amostragem incorreta, degradação ou perda do ADN durante a extração ou inibidores na eluição), que pode causar resultados incorretos.

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

Amostras reportadas como “PVB19: DNA Not detected or below “LoD” copies/mL” (PVB19:DNA não detetado ou abaixo de “LoD” cópias/mL) são adequadas para análise mas não foi detetado PVB19. Neste caso, a amostra pode ser negativa para ADN de PVB19 ou o ADN de PVB19 está presente numa concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver “Características de desempenho”).

Amostras positivas do ADN de PVB19 a uma concentração abaixo do Limite de Deteção (e Limite Inferior da Quantificação) do ensaio, se detetado, são relatados como “PVB19: DNA Detected, quantity below “LLOQ” copies/mL” (PVB19:DNA detetado, quantidade abaixo “LLOQ” cópias/mL) (consulte “Características de desempenho”).

São detetadas amostras positivas de ADN de PVB19 no Intervalo de Medição Linear que são relatadas como “PVB19: DNA Detected, quantity equal to “XXX” copies / mL” (PVB19:DNA detetado, quantidade igual a “XXX” cópias/mL) (ver “Características de desempenho”).

Amostras positivas de ADN de PVB19 que estão acima do Limite Superior de Quantificação são relatadas como “PVB19: DNA Detected, quantity beyond “ULOQ” copies/mL” (PVB19: 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 (ver “Características de desempenho”).

Nota: 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).

D. 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 da calha) apresenta os detalhes do resultado pelo Rastreamento selecionado.

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

PROCEDIMENTO do ELiTe BeGenius

O procedimento para utilização do **Parvovirus B19 ELiTe MGB Kit** com o sistema **ELiTe BeGenius** consiste em três passos:

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

PASSO 1 - Verificação da disponibilidade do sistema

Antes de iniciar a sessão:

- ligue o **ELiTe BeGenius** e inicie sessão no modo “CLOSED”,

- no menu “Calibrations” (Calibrações) na página inicial, verifique se os calibradores (**PVB19 Q - PCR Standard**) estão aprovados e são válidos (estado) para o lote de **PVB19 PCR Mix** a ser utilizado. Caso não haja calibradores válidos para o lote de **PVB19 PCR Mix**, realize a calibração conforme descrito nas secções seguintes,

- no menu “Controls” (Controlos) da página inicial, **verifique se os controlos de PCR (PVB19 Positive Control, PVB19 Negative Control) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de PVB19 PCR Mix a ser utilizado.** Caso não haja controlos de PCR válidos disponíveis para o lote da **PVB19 PCR Mix** execute os controlos de PCR conforme descrito nas secções seguintes,

escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela EG SpA (consulte “Amostras e Controlos”).

Se o Assay Protocol (Protocolo de 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.

PASSO 2 – Configuração da sessão

O **PVB19 ELiTe MGB Kit** pode ser usado no **ELiTe BeGenius** para realizar:

- 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]).

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

Nota: 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 da **PVB19 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.

Nota: 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 2mL (não fornecido) 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" (Página inicial).	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial).
3	Retire os Suportes da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.	Retire os "Racks" de "Lane 1, 2 and 3" (L1, L2, L3) da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
4	Selecione o "Run mode": "Extract + PCR" (Extrair + PCR)	Selecione o "Run mode": "PCR Only".
5	Carregue as amostras no "Sample Rack" (Suporte da amostras). (Nota: quando os tubos secundários "2 mL Tubes" (Tubos de 2 mL) forem carregados, use adaptadores azuis para o "Sample Rack" (Suporte de amostras).	Carregue as amostras no "Elution Rack" (Rack de eluição).
6	Insira o "Sample Rack" (Suporte da amostra) na "Cooler Unit" começando a partir da "Lane 5" (L5). Se necessário, insira a "Sample ID" (Identificação da amostra) (SID) para cada "Position" usada. Se forem carregados tubos secundários, assinale "2 mL Tube" (Tubo de 2 mL). Se os tubos secundários não possuírem código de barras, digite manualmente a "Sample ID").	Insira o "Elution Rack" (Rack de eluição) na "Cooler Unit" começando a partir da "Lane 3" (L3). Se necessário, para cada "Position" (Posição), insira a "Sample ID" (Identificação da amostra), a "Sample matrix" (Matriz da amostra), o "Extraction kit" (Kit de extração) e o "Extracted eluate vol." (Volume de eluato extraído).
7	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
8	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 µL.	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 µL.
9	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").
10	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
11	Quando forem processadas mais de 12 amostras, repita o procedimento a partir do ponto 6.	Quando forem processadas mais de 12 amostras, repita o procedimento a partir do ponto 6.
12	Coloque os " Elution tubes " (Tubos de eluição) no " Elution Rack " (Rack de eluição) (os tubos de eluição podem ser etiquetados com código de barras para melhorar a capacidade de localização).	Não aplicável
13	Insira o " Elution Rack " (Rack de eluição) 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 " (Rack de PCR) com a " PCR Cassette " (Cassete de PCR) na Inventory Area (área dos reagentes).	Coloque o " PCR Rack " (Rack de PCR) com a " PCR Cassette " (Cassete de PCR) na Inventory Area (área dos reagentes).
21	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
22	Carregue o " Extraction Rack " (Rack de extração) com os cartuchos de extração "ELITE InGenius SP 200" e os consumíveis de extração necessários.	Não aplicável
23	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
24	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).

	C. Execução da calibração (PCR only [Apenas PCR])	D. Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [Apenas PCR])
1	<p>Descongele os tubos de Q-PCR Standard tubes (Cal1: Q-PCR Standard 10², Cal2: Q-PCR Standard 10³, Cal3: Q-PCR Standard 10⁴, Cal4: Q-PCR Standard 10⁵) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.</p>	<p>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.</p> <p>Prepare o Negative Control, transfira pelo menos 50 µL de água de qualidade para biologia molecular para um "Elution tube" (Tubo de eluição), fornecido com o ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.</p>
2	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial).	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial)
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" começando a partir da "Lane 3" (L3). Se necessário, para cada "Position" introduza o "Reagent name" 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" começando a partir da "Lane 3" (L3). Se necessário, para cada "Position" introduza o "Reagent name" e o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).
7	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
8	Verifique o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) (200 µL) e o "Extracted Elute Volume" (Volume de eluato do extraído) (100 µL).	Verifique o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) (200 µL) e o "Extracted Elute Volume" (Volume de eluato do extraído) (100 µL).
9	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").
10	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
11	Carregue a PCR Mix no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).	Carregue a PCR Mix no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).
12	Insira o "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição) na "Cooler Unit" na "Lane 2" (L2). Se necessário, para cada PCR Mix, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).	Insira o "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição) na "Cooler Unit" (Unidade refrigeradora) na "Lane 2" (L2). Se necessário, para cada PCR Mix, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).
13	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
14	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua o suporte(s) de pontas, se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua o suporte(s) de pontas, se necessário.
15	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.

16	Coloque o "PCR Rack" (Rack de PCR) com a "PCR Cassette" (Cassete de PCR) na Inventory Area (área dos reagentes).	Coloque o "PCR Rack" (Rack de PCR) com a "PCR Cassette" (Cassete de PCR) na Inventory Area (área dos reagentes).
17	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
18	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
19	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).

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

Nota: 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.

Nota: 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.

Nota: No final da execução, o restante **Q-PCR Standard** pode ser removido do instrumento, fechado e guardado a -20 °C ou menos. Evite derramar o Q - PCR Standard.

Nota: O **PVB19 Q-PCR Standard** pode ser usado para 4 sessões separadas de 2 horas cada.

Nota: No final da execução o restante **Positivo Control** deve ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C ou menos. Evite derramar **Positive Control**. O restante **negative control** deve ser eliminado.

Nota: O **PVB19 Positive Control** pode ser usado para 4 sessões separadas de 3 horas cada.

Nota: 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.

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.

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.

Nota: 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 utilizando o **Parvovirus B19 ELiTe MGB Kit** através do seguinte procedimento:

- Validação da Curva de calibração,
- Validação dos resultados do Controlo Positivo e Controlo Negativo,
- Validação dos resultados da amostra,
- Elaboração do relatório do resultado da amostra.

Nota: Para mais informações, consulte o mesmo parágrafo do Procedimento do ELiTe InGenius.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM ELiTe InGenius e ELiTe BeGenius

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 determinado testando no ELiTe InGenius usando o ADN de plasmídeo que contém o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. O ADN plasmídico foi diluído a um título de 10 cópias/20 µL na presença de ADN genómico humano a um título de 500 ng/20 µL. Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

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

Sangue Total colhido em EDTA

O valor do LdD teórico foi verificando testando no ELiTe InGenius e no ELiTe BeGenius um universo de amostras de sangue total colhido em EDTA reforçadas com material de referência do Parvovirus B19 (3rd WHO International Standard, NIBSC) à concentração declarada (125 IU / mL).

Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de sangue total no ELiTe InGenius e no ELiTe BeGenius

Amostra	LdD	N	Válido	Positivo	Negativo
Sangue Total colhido em EDTA	125 IU/mL	20	20	20	0
	250 cópias/mL				

Os resultados obtidos confirmaram a alegada concentração para o alvo de Parvovirus B19 ELiTe MGB Kit tanto no ELiTe InGenius como no ELiTe BeGenius. O valor do LdD para o alvo de PVB19 em associação com as amostras de sangue total foi confirmado como 125 IU/mL, correspondente a 250 cópias/mL.

O valor em cópias/mL é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado no parágrafo "Analytical sensitivity" (Sensibilidade analítica).

Líquido amniótico

O LdD do ensaio usado em associação com líquido amniótico foi determinado no instrumento ELiTe InGenius, testando um painel de líquido amniótico negativo para Parvovirus B19 (PVB19) e reforçado com material de referência de PVB19 (3rd WHO International Standard, NIBSC). Foi executada a análise de regressão Probit nos resultados, e estimou-se como LdD a concentração correspondente a 95% de probabilidade de um resultado positivo.

Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de líquido amniótico e ELiTe InGenius

Alvo	LdD	intervalo de confiança de 95%	
		Limite inferior	Limite superior
PVB19	40 IU/mL	35 IU/mL	50 IU/mL
	40 cópias/mL	35 cópias/mL	50 cópias/mL

O LdD como cópias/mL para líquido amniótico foi calculado através da aplicação do fator de conversão específico (1 UI/cópia) reportado no parágrafo "Analytical sensitivity" (Sensibilidade analítica).

O valor do LdD calculado foi verificado testando no ELiTe InGenius e ELiTe BeGenius um universo de líquido amniótico reforçado com material de referência certificado PVB19 (3rd WHO International Standard, NIBSC) à concentração declarada.

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

Os resultados obtidos confirmaram a alegada concentração para o alvo de Parvovirus B19 ELiTe MGB Kit tanto no ELiTe InGenius como no ELiTe BeGenius.

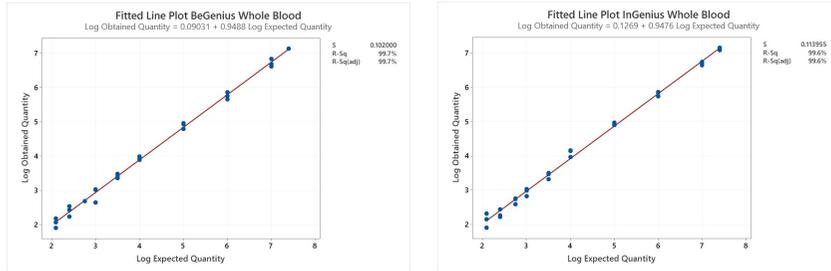
Sensibilidade analítica: intervalo de medição linear

O intervalo de medição linear do ensaio foi verificado com amostras de sangue total e líquido amniótico no ELiTe InGenius e ELiTe BeGenius.

Para sangue total colhido em EDTA

O intervalo de medição linear foi verificado usando um painel de diluições de material de referência de PVB19 (3rd WHO International Standard, NIBSC) em amostras de sangue total em EDTA negativas.

Os resultados são comunicados nas figuras seguintes.



Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

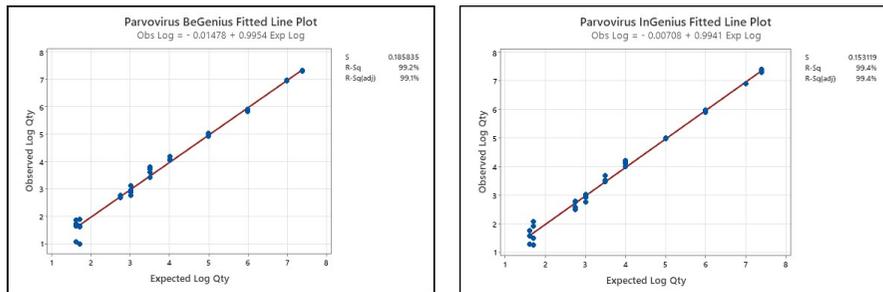
Intervalo de medição linear para amostras de sangue total e o ELiTe InGenius e ELiTe BeGenius		
Unidade	Limite inferior	Limite superior
IU/mL	125	25,000,000
cópias/mL	250	50,000,000

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

Para líquido amniótico

O intervalo de medição linear foi determinado com recurso a um painel de diluições do material de referência PVB19 (NIBSC) em amostras de líquido amniótico em EDTA negativas.

Os resultados são comunicados nas figuras seguintes.



Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear para amostras de líquido amniótico e o ELiTe InGenius e ELiTe BeGenius		
Unidade	Limite inferior	Limite superior
IU/mL	40	25,000,000
cópias/mL	40	25,000,000

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

Repetibilidade

A repetibilidade intra-sessão e inter-sessão do ensaio foi avaliada no ELiTe InGenius e no ELiTe BeGenius através da análise de um painel de amostras de sangue total colhido em EDTA, incluindo uma amostra negativa e duas amostras enriquecidas com material de referência certificado de PVB19 (3rd WHO International Standard, NIBSC).

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

Repetibilidade intra-sessão ELiTe InGenius					
Amostra	PVB19				
	Nº	Ct médio	SD	% CV	% Concordância
Negativo	8	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3 x LoD	8	35,81	0,52	1,46	100%
10 x LoD	8	34,31	0,28	0,83	100%

Repetibilidade intra-sessão ELiTe BeGenius					
Amostra	PVB19				
	Nº	Ct médio	SD	% CV	% Concordância
Negativo	8	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3 x LoD	8	36,53	0,53	1,46	100%
10 x LoD	8	34,79	0,21	0,61	100%

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

Repetibilidade inter-sessão ELiTe InGenius					
Amostra	PVB19				
	Nº	Ct médio	SD	% CV	% Concordância
Negativo	16	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3 x LoD	16	35,87	0,44	1,23	100%
10 x LoD	16	34,19	0,28	0,83	100%

Repetibilidade inter-sessão ELiTe BeGenius					
Amostra	PVB19				
	Nº	Ct médio	SD	% CV	% Concordância
Negativo	16	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3 x LoD	16	36,40	0,45	1,23	100%
10 x LoD	16	34,68	0,27	0,79	100%

No teste de repetibilidade, o Parvovirus B19 ELiTe MGB Kit detetou o alvo e apresentou uma variabilidade máxima dos valores de Ct do alvo como %CV igual a 1,46%.

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade interinstrumentos e interlote do ensaio foi avaliada no ELITE InGenius e no ELITE BeGenius através da análise de um painel de amostras de sangue total, colhido em EDTA, incluindo uma amostra negativa e duas amostras enriquecidas com material de referência certificado PVB19 (3rd WHO International Standard, NIBSC).

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

Capacidade de reprodução inter-instrumento ELITE InGenius					
Amostra	PVB19				
	Nº	Ct médio	SD	% CV	% Concordância
Negativo	8	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3 x LoD	8	36,89	0,62	1,68	100%
10 x LoD	8	34,85	0,26	0,74	100%

Capacidade de reprodução inter-instrumento ELITE BeGenius					
Amostra	PVB19				
	Nº	Ct médio	SD	% CV	% Concordância
Negativo	8	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3 x LoD	8	37,00	0,37	1,00	100%
10 x LoD	8	35,14	0,51	1,46	100%

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

Repetibilidade interlote ELITE InGenius					
Amostra	PVB19				
	Nº	Ct médio	SD	% CV	% Concordância
Negativo	8	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3 x LoD	8	36,80	0,67	1,82	100%
10 x LoD	8	35,18	0,71	2,02	100%

Repetibilidade interlote ELITE BeGenius					
Amostra	PVB19				
	Nº	Ct médio	SD	% CV	% Concordância
Negativo	8	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3 x LoD	8	37,41	0,27	0,72	100%
10 x LoD	8	35,31	0,32	0,90	100%

No teste de reprodutibilidade inter-instrumento e inter-lote, o Parvovirus B19 ELITE MGB Kit detetou corretamente todas as amostras conforme esperado e apresentou uma variabilidade máxima dos valores de Ct do alvo como %CV igual a 2,02%.

Sensibilidade analítica: capacidade de reprodução com material de referência certificado

A sensibilidade analítica do ensaio, como a capacidade de reprodução dos valores de um material de referência calibrado, foi avaliada utilizando como material de referência o painel calibrado QCMD 2014 B19 Virus DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, UK), um painel de diluições de PVB19. Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação do resultado, utilizando o **ELITE InGenius** e produtos ELITechGroup S.p.A..

Os resultados em IU/mL foram calculados através da aplicação do fator de conversão (Fc = 0,3 UI/cópia) para o **ELITE InGenius** e plasma e são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o ELITE InGenius®

Amostra	Consenso Vírus conc. Log ₁₀ IU / mL	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios Log ₁₀ IU / mL
B19DNA14-01	4,788	0,507	2/2	4,948
B19DNA14-02	2,878	0,437	2/2	2,902
B19DNA14-03	4,848	0,400	2/2	4,850
B19DNA14-04	Negativo	N/A	0/2	N/A
B19DNA14-05	5,802	0,465	2/2	5,847
B19DNA14-06	1,936	0,672	2/2	1,779
B19DNA14-07	3,913	0,371	2/2	3,955
B19DNA14-08	3,844	0,507	2/2	4,063

Todas as amostras foram detetadas corretamente. Todas as amostras positivas foram quantificadas dentro do intervalo definido pelo Desvio Padrão (SD) Consenso ± 1.

Fator de conversão para unidades internacionais

O fator de conversão (Fc) para relatar os resultados quantitativos em Unidades internacionais (IU)/mL a partir de cópias/mL, foi calculado no ELITE InGenius utilizando material de referência calibrado certificado de PVB19 (NIBSC).

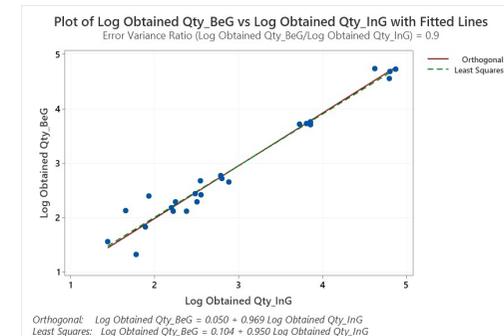
Sangue Total colhido em EDTA

O fator de conversão foi determinado como sendo 0,5 UI/cópia no ELITE InGenius usando um painel de diluições de material de referência de PVB19 (2th WHO International Standard, NIBSC) em amostras de sangue total em EDTA negativas.

Na tabela seguinte é apresentado um resumo dos resultados.

Fator de conversão para unidades internacionais, Fc = 0,5 IU/cópia						
IU/mL	Amostra		Resultado			Log diferença (ref. - teste)
	IU/mL de Registo	N	Média de cópias/mL	Média IU / mL	Média Registo IU / mL	
100,000	5,0000	10	21,4661	107,331	5,0210	-0,0210
10,000	4,0000	10	21,433	10,716	4,0080	-0,0080
1,000	3,0000	10	2,136	1,068	2,9850	+0,0150

O valor do fator de conversão foi verificado no **ELITE InGenius** e no **ELITE BeGenius** usando material de referência calibrado certificado (3th WHO International Standard, NIBSC), verificado de 5.0000 Log IU / mL a 2.0970 Log IU / mL. Os resultados obtidos foram analisados por regressão ortogonal e linear para calcular a sua correlação.



A análise de regressão ortogonal gerou um declive igual a 0,050 (95% CI: 0,197; 0,296) e um declive igual a 0,969 (95% CI: 0,889 – 1,048). A análise de regressão linear gerou um R² de 0,963.

Parvovirus B19 ELITE MGB® Kit
reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

Líquido amniótico

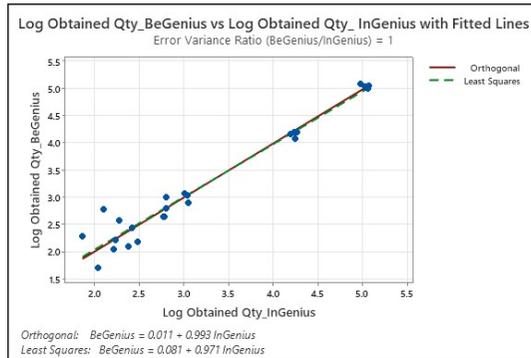
O fator de conversão foi determinado como sendo 1 UI/cópia no ELITE InGenius usando um painel de diluições de material de referência de PVB19 (3rd WHO International Standard, NIBSC) em amostras de líquido amniótico negativas.

Na tabela seguinte é apresentado um resumo dos resultados.

Fator de conversão para unidades internacionais, Fc = 1 IU/cópia						
Amostra			Resultado			Log diferença (ref. - teste)
IU/mL	IU/mL de Registo	N	Média de cópias/mL	Média IU / mL	Média Registo IU / mL	
316,228	5,0000	16	273,604	273,604	5,4360	0,0640
100,000	5,0000	16	88,997	88,997	4,9470	0,0530
31,623	4,5000	16	34,559	34,559	4,5340	-0,0340
10,000	4,0000	16	11,089	11,089	4,0390	-0,0390
3,162	3,5000	15*	3,704	3,704	3,5580	-0,0580
1000	3,0000	16	932	932	2,9520	0,0480

*Um mesmo resultado como um valor atípico foi excluído pela análise.

O valor do fator de conversão foi verificado no **ELITE InGenius** e no **ELITE BeGenius** usando material de referência calibrado certificado (3th WHO International Standard, NIBSC), verificado de 5.0000 Log IU / mL a 2.0970 Log IU / mL. Os resultados obtidos foram analisados por regressão ortogonal e linear para calcular a sua correlação.



A análise de regressão ortogonal gerou um declive igual a 0,0112 (95% CI: 0,2879; 0,3103) e um declive igual a 0,9928 (95% CI: 0,9046 – 1,0810). A análise de regressão linear gerou um R² de 0,957.

Os resultados de cada matriz são resumidos na tabela seguinte.

Fator de conversão para unidades internacionais com o ELITE InGenius e ELITE BeGenius	
Matriz	Fc (IU/cópias)
Sangue Total	0,5
Líquido amniótico	1,0

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A Sensibilidade de Diagnóstico do ensaio, avaliadas por amostras clínicas positivas, foi avaliada em associação com o **ELITE InGenius** através da análise de amostras clínicas de sangue total colhido em EDTA e líquido amniótico certificadas positivas para o alvo ou reforçadas com material de referência. Dado que o **ELITE BeGenius** tem desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITE InGenius**, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a sensibilidade do diagnóstico do ensaio obtido em associação com o **ELITE InGenius** também se aplica ao **ELITE BeGenius**.

Parvovirus B19 ELITE MGB® Kit
reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	Positivo	Negativo	% Sensibilidade de diagnóstico
Sangue total colhido em EDTA e reforçado com ADN de PVB19	30	30	0	100
Líquido amniótico reforçado para ADN de PVB19	30	30	0	100

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

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

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	Positivo	Negativo	% de especificidade do diagnóstico
Sangue total colhido em EDTA e negativo para ADN de PVB19	30	0	30	100
Líquido amniótico negativo para ADN de PVB19	30	0	30	100

O valor-limite de Ct do CI foi definido para 35 para as amostras de sangue total colhidas em EDTA e as amostras de líquido amniótico quando testadas com o **ELITE InGenius** e o **ELITE BeGenius**.

AMOSTRAS E CONTROLOS PARA OUTROS SISTEMAS

Amostras

Este produto deve ser usado com **ADN extraído** das seguintes amostras clínicas: sangue total (periférico e da medula óssea) colhido em EDTA, plasma colhido em EDTA.

Sangue Total colhido em EDTA

As amostras de sangue total (periférico e da medula óssea) para extração de ácidos nucleicos devem ser colhidas em EDTA de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas a +2°/+8 °C e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de três dias, caso contrário, devem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

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

Quando utilizar amostras congeladas, descongele as mesmas apenas imediatamente antes da extração, para evitar uma possível degradação do ácido nucleico.

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

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

Plasma colhido em EDTA

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

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

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

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

NOTA: quando realizar a extração de ADN a partir do plasma com o instrumento **«NucliSENS® easyMAG®»**, siga o protocolo de extração **Generic 2.0.1** e siga estas instruções: transfira **500 µL** da amostra para a tira de 8 furos, adicione **5 µL de CPE** para o controlo interno antes de adicionar a **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica**. Elua os ácidos nucleicos em **100 µL** de tampão de eluição.

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

Outras amostras:

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

Substâncias interferentes

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

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

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

Controlos de amplificação

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

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

Para o controlo positivo, utilize o produto **«Parvovirus B19 - ELiTe Positive Control»** ou o produto **«Parvovirus B19 ELiTe Standard»**.

Controlos da qualidade

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

PROCEDIMENTO NOUTROS SISTEMAS

Definição da sessão de amplificação em tempo real

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

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

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

- ligar o ciclo térmico em tempo real, ligar o computador, executar o software dedicado e abrir uma sessão "quantificação absoluta";
- definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda PVB19 com o "dispositivo de relatório" = "FAM" e o "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) e dar-lhe o nome "PVB19";
- 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 "CI";
- para cada furo em utilização na microplaca, defina (Inspetor do furo) o "detetor" (tipo de fluorescência a ser medida), a "referência passiva" = "ROX" (é usado AP593 em vez de ROX, normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (amostra, controlo de amplificação negativo, controlo de amplificação positivo ou padrão de quantidade conhecido). Adicione esta informação à **Ficha de trabalho** anexada no final deste manual ou imprima a preparação da microplaca. A **Ficha de trabalho** deve ser atentamente seguida durante a transferência da mistura de reação e das amostras para os furos.

NOTA: Para determinar o título ADN na amostra inicial, prepare uma série de reações com o **Q - PCR Standards** (10⁵ 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- ligar o ciclo térmico em tempo real, ligar o computador, executar o software dedicado e abrir uma sessão "quantificação absoluta", bem como definir o "Modo de execução: Rápido 7500";
- definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda PVB19 com o "dispositivo de relatório" = "FAM" e o "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) e dar-lhe o nome "PVB19";
- definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda de controlo interno com o "dispositivo de relatório" = "VIC" (AP525 é semelhante ao VIC) e o "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) e dar-lhe o nome "CI";
- para cada furo em utilização na microplaca, defina (Inspetor do furo) o "detetor" (tipo de fluorescência a ser medida), a "referência passiva" = "Cy5" (é usado AP593 em vez de Cy5, para a normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (amostra, controlo de amplificação negativo, controlo de amplificação positivo ou padrão de quantidade conhecido). Adicione esta informação à **Ficha de trabalho** anexada no final deste manual ou imprima a preparação da microplaca. A **Ficha de trabalho** deve ser atentamente seguida durante a transferência da mistura de reação e das amostras para os furos.

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

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

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

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

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

- modifique o tempo como indicado na tabela "**Ciclo térmico**";
- defina o número de ciclos para **45**;
- defina o volume para a emulação de software de transferência térmica para a reação ("Volume da amostra") para **30 µL**;

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

Ciclo térmico		
Fase	Temperaturas	Tempo
Descontaminação	50 °C	2 min.
Desnaturação inicial	94 °C	2 min.
Amplificação e deteção (45 ciclos)	94 °C	10 seg.
	60 °C (recolha de dados)	30 seg.
	72 °C	20 seg.
Dissociação (opcional)	95 °C	15 seg.
	40 °C	1 min.
	80 °C	15 seg.
Dissociação (opcional)	60 °C	15 seg.

Preparação da amplificação

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

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

- descongelar os tubos que contêm as amostras a serem analisadas. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo;
- descongele os tubos da **PVB19 Q - PCR Mix** necessários para a sessão, sem esquecer que cada tubo é suficiente para a preparação de **25 reações**. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo;
- descongele o **PVB19 - Positive Control** ou os tubos **PVB19 Q - PCR Standard**. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo;
- pegue na **Microplaca da amplificação** que será usada durante a sessão, tendo cuidado para manusear a mesma com luvas sem pó e para não danificar os furos.

1. Com a pipeta, introduza exatamente **20 µL da PVB19 Q - PCR Mix** no fundo dos poços da **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Evite a criação de bolhas.

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

2. Com a pipeta, introduza exatamente, colocando na mistura de reação, **20 µL de ADN extraído** da primeira amostra no furo correspondente da **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem a amostra introduzindo com a pipeta o **ADN extraído** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma com as outras amostras de **ADN extraído**.
3. Com a pipeta, introduza exatamente, colocando na mistura de reação, **20 µL de água de qualidade para biologia molecular** (não fornecida com este produto) no furo da **microplaca da amplificação** do controlo negativo da amplificação, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o controlo negativo introduzindo com a pipeta a **água de qualidade para biologia molecular** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.
4. Com base no resultado necessário (qualitativo ou quantitativo), deve seguir uma das destas duas opções:

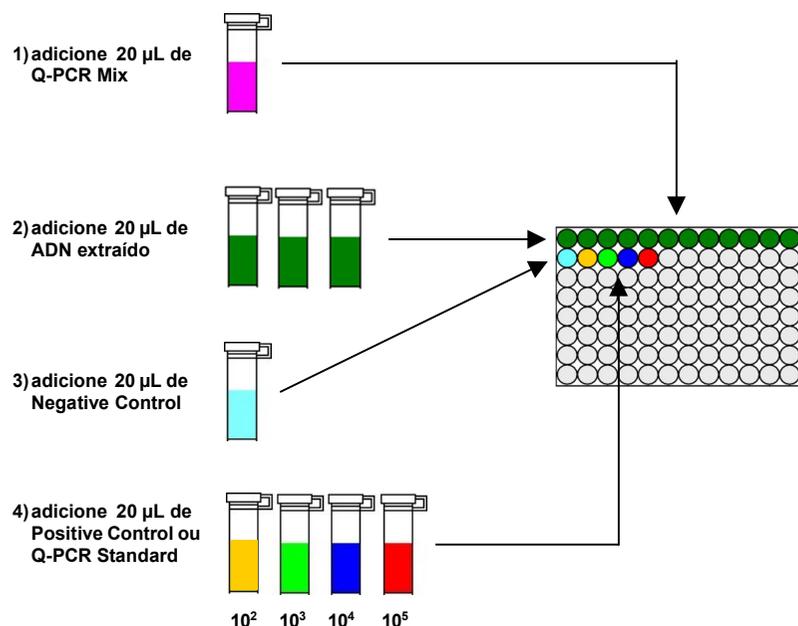
- quando for necessário um resultado **qualitativo** (deteção de ADN de PVB19): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL de PVB19 - Positive Control** no furo correspondente na **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o controlo positivo introduzindo com a pipeta o **PVB19 - Positive Control** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.

Quando for necessário um resultado **quantitativo** (quantificação de ADN de PVB19): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL de PVB19 Q - PCR Standard 102** no furo correspondente na **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o padrão introduzindo com a pipeta o **PVB19 Q - PCR Standard 102** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma com os outros **PVB19 Q - PCR Standards (103, 104, 105)**.

- Vede com precisão a **microplaca da amplificação** com recurso à **folha vedante da amplificação**.
- Transfira a **microplaca da amplificação** para o ciclo térmico em tempo real na área de amplificação/detecção de produtos de amplificação e inicie o ciclo térmico para a amplificação guardando a definição da sessão com um nome de ficheiro inequívoco e reconhecível (por ex., "ano-mês-dia-PVB19-EGSpA").

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

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



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

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

Análise qualitativa dos resultados

Os valores registados da fluorescência emitida pela sonda específica do PVB19 (detetor FAM "PVB19") e pela sonda específica do controlo interno (detetor VIC "CI") nas reações de amplificação devem ser analisados pelo software do instrumento.

Antes de iniciar a análise, e através da consulta da documentação do instrumento, é necessário:
- definir manualmente (Resultados > Lote da amplificação > delta Rn vs Ciclo) o intervalo de cálculo para a **Linha de base** (nível de fundo de fluorescência) do ciclo 6 ao ciclo 15;

NOTA: No caso de uma amostra positiva com um elevado título de ADN de PVB19, a fluorescência FAM da sonda específica do PVB19 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 "PVB19" 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 "PVB19" 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 PVB19 (Resultados > Relatório) é usado para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Detetor de reação de controlo positivo FAM "PVB19"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação **Positive Control** para a **Ct > 25** ou **Ct indeterminada** para PVB19, o ADN do alvo não foi corretamente detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação ou deteção (distribuição incorreta da mistura de reação ou do controlo positivo, degradação da mistura de reação ou do controlo positivo, definição incorreta da posição do controlo positivo, definição incorreta do ciclo térmico) que podem originar resultados incorretos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

* **NOTA:** Quando este produto for usado para a quantificação de ADN de PVB19, foram preparadas as reações de **Q - PCR Standard** em vez da reação de **Positive Control**. Neste caso, valide a amplificação e a deteção através da referência à reação de amplificação de **Q - PCR Standard 10s (Ct ≤ 25)**.

Na reação de amplificação do **Negative Control**, o valor da **Ct** do PVB19 (Resultados > Relatório) é usado para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Negative Control reaction detector FAM "PVB19"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct não determinado	NEGATIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação **Controlo negativo** for diferente de **Ct não determinado** para PVB19, o ADN alvo não foi detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação (contaminação), que podem originar resultados incorretos e falsos positivos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

Na reação de amplificação de cada **amostra**, o valor de **Ct** do PVB19 é usado para determinar o ADN alvo, enquanto o valor de **Ct** do Internal Control é usado para validar a extração, amplificação e deteção.

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

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

Este produto é capaz de detetar uma quantidade mínima de cerca de 10 cópias de ADN da região VP1 do PVB19 na reação de amplificação (limite de deteção, consulte o parágrafo Características de desempenho).

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

Reação da amostra		Adequação da amostra	Resultado do ensaio	ADN de PVB19
detetor FAM "PVB19"	detetor VIC "IC"			
Ct não determinado	Ct > 35 ou Ct não determinado	inadequado	inválido	-
	Ct ≤ 35	adequado	válido, negativo	NÃO DETETADO
Ct determinado	Ct > 35 ou Ct não determinado	adequado	válido, positivo	DETETADO
	Ct ≤ 35	adequado	válido, positivo	DETETADO

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct não determinado** para o PVB19 e **Ct > 35** ou **Ct não determinado** para o Controlo interno, significa que foi impossível detetar eficientemente o ADN para o Controlo interno. Neste caso, ocorreram problemas durante o passo de amplificação (amplificação ineficiente ou ausente) ou durante o passo de extração (degradação da amostra de ADN, a amostra com número insuficiente de células, perda de ADN durante a extração ou presença de inibidores) que podem causar resultados incorretos e falsos negativos. A amostra não é adequada, o ensaio é inválido e precisa ser repetido, começando pela extração de uma nova amostra.

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct não determinado** para o PVB19 e **Ct ≤ 35** para o Internal Control, significa que o ADN do PVB19 não é detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode excluir-se o facto de o ADN do PVB19 ter um título mais baixo que o limite de deteção do produto (consulte o parágrafo sobre as Características de desempenho). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

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

NOTA: Quando o ADN do PVB19 é detetado na reação de amplificação de uma amostra, o Internal Control pode resultar em Ct > 35 ou Ct não determinado. Na realidade, a reação de amplificação de baixa eficiência para o Controlo Interno pode ser deslocada por concorrência com a reação de amplificação de elevada eficiência para o ADN do PVB19. Neste caso, a amostra é contudo adequada e o resultado positivo do ensaio é válido.

Análise quantitativa dos resultados

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

Nas reações de amplificação dos quatro **Q - PCR standards**, os valores de **Ct** do PVB19 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:

Standard Curve detector FAM "PVB19"	Intervalo de aceitação	Amplificação/deteção
Coefficiente de correlação (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRETO

Se o valor do **Coefficiente de correlação (R2)** não se encontrar dentro dos limites, isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação ou 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.

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

Os valores de **Ct** do PVB19 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 VP1 de PVB19 na reação de amplificação (intervalo de medição linear, consulte Características de desempenho), tal como descrito na tabela seguinte:

Sample result detector FAM "PVB19"	Cópias PVB19 por reação
Quantidade > 1 x 10 ⁶	MAIS DE 1.000.000
1 x 10 ¹ ≤ Quantidade ≤ 1 x 10 ⁶	= Quantidade
Quantidade < 1 x 10 ¹	MENOS DE 10

Os resultados (**Quantidade**) de **amostras** (Resultados > Relatório) são usados para calcular as cópias de PVB19 presentes na amostra usada na extração (**Nc**) de acordo com esta fórmula:

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

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 cópias por reação**,

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

Fórmula simplificada para sangue total, plasma e o «ELiTe STAR»
Nc (cópias/mL) = 28 x Quantidade

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

Fórmula simplificada para sangue total, plasma e o «ELiTe GALAXY»
Nc (cópias/mL) = 35 x Quantidade

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

Fórmula simplificada para plasma e «NucliSENS® easyMAG®»
Nc (cópias/mL) = 10 x Quantidade

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

Fórmula simplificada para plasma e «QIASymphony® SP/AS»
Nc (cópias/mL) = 12 x Quantidade

Cálculo dos limites do intervalo de medição linear

Quando é usado um método de extração em particular, os limites da amostra, podem ser calculados a partir do intervalo de medição linear da reação de amplificação de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Limite inferior (cópias/mL)} = \frac{V_e \times 10 \text{ cópias}}{V_c \times V_a \times E_p}$$

$$\text{Limite superior (cópias/mL)} = \frac{V_e \times 1.000.000 \text{ cópias}}{V_c \times V_a \times E_p}$$

Quando é usado o sistema de extração «ELiTe STAR» com amostras de sangue total colhido em EDTA e amostras de plasma colhido em EDTA, a fórmula passa a ser:

Limites do intervalo de medição (cópias/mL) com ELiTe STAR
Limite inferior (cópias/mL) = 28 x 10 cópias
Limite superior (cópias /mL) = 28 x 1.000.000 cópias
de 280 a 28.000.000 cópias/mL

Quando é usado o sistema de extração «ELiTe GALAXY» com amostras de sangue total colhido em EDTA e amostras de plasma colhido em EDTA, a fórmula passa a ser:

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

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

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

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

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

Conversão dos resultados em unidades internacionais (IU)

Fc é o fator de conversão estabelecido utilizando o material de referência calibrado aprovado pela OMS "2.ª Norma internacional da OMS para para ADN de Parvovirus B19 para ensaio de amplificação de ácido nucleico (NAT)", NIBSC ref. 99/802, Reino Unido (ver o parágrafo Características de desempenho).

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

Fórmula simplificada para sangue total e o ELiTe STAR
Fc = 0,98 IU/cópias
Nc (IU / mL) = Nc (cópias/mL) x Fc
Nc (IU/mL) = 27,4 x Quantidade

Quando é usado o kit de extração «ELiTe STAR» com amostras de plasma colhido em EDTA e é necessário o resultado **expresso em IU/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para plasma e ELiTe STAR
Fc = 0,69 IU/cópias
Nc (IU / mL) = Nc (cópias/mL) x Fc
Nc (IU/mL) = 19,3 x Quantidade

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

Fórmula simplificada para sangue total e o ELiTe GALAXY
Fc = 0,82 IU/cópias
Nc (IU / mL) = Nc (cópias/mL) x Fc
Nc (IU/mL) = 28,7 x Quantidade

Quando é usado o kit de extração «ELiTe GALAXY» com amostras de plasma colhido em EDTA e é necessário o resultado **expresso em IU/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para plasma e «ELiTe GALAXY»
Fc = 0,87 IU/cópias
Nc (IU / mL) = Nc (cópias/mL) x Fc
Nc (IU/mL) = 30,5 x Quantidade

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

Fórmula simplificada para plasma e «NucliSENS® easyMAG®»
Fc = 1 IU/cópias
Nc (IU / mL) = Nc (cópias/mL) x Fc
Nc (IU/mL) = 10 x Quantidade

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

Fórmula simplificada para plasma e «QIASymphony® SP/AS»
Fc = 1 IU/cópias
Nc (IU / mL) = Nc (cópias/mL) x Fc
Nc (IU/mL) = 12 x Quantidade

**CARACTERÍSTICAS
DE DESEMPENHO COM OUTROS SISTEMAS**

Sensibilidade analítica: limite de deteção

A sensibilidade analítica deste ensaio permite a deteção da presença de cerca de 10 moléculas de ADN alvo em 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

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

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

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

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de sangue total e o **ELiTe STAR** foi verificada com um painel de diluições de B19 dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da "2.ª Norma internacional da OMS para para ADN de Parvovirus B19 para ensaio de amplificação de ácido nucleico (NAT)" (NIBSC código 99/802, Reino Unido) em ADN de B19 - sangue total EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 3,161 IU/mL a 1000 IU/mL. Cada amostra do painel foi testado em 12 réplicas através da realização do procedimento de toda a análise: extração com o **ELiTe STAR** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%. Os resultados finais são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de sangue total e ELiTe STAR (IU/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	293 IU/mL	159 IU/mL	1053 IU/mL

Limite de deteção para amostras de sangue total e ELiTe STAR (cópias/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	299 cópias/mL	162 cópias/mL	1074 cópias/mL

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de plasma e o «**ELiTe STAR**» foi verificada com um painel de diluições de Parvovirus B19 dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da "2.ª Norma internacional da OMS para para ADN de Parvovirus B19 para ensaio de amplificação de ácido nucleico (NAT)" (NIBSC código 99/802, Reino Unido) em ADN Parvovirus B19 - plasma em EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 3,161 IU/mL a 1000 IU/mL. Cada ponto do painel foi testado em 8 réplicas através da realização do procedimento de toda a análise: extração com o **ELiTe STAR** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

Os resultados finais são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de plasma e ELiTe STAR (IU/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	100 IU/mL	45 IU/mL	987 IU/mL

Limite de deteção para amostras de plasma e ELiTe STAR (cópias/mL)

		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	145 cópias/mL	65 cópias/mL	1430 cópias/mL

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de sangue total e o **ELiTe GALAXY** foi verificada com um painel de diluições de B19 dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da "2.ª Norma internacional da OMS para para ADN de Parvovirus B19 para ensaio de amplificação de ácido nucleico (NAT)" (NIBSC código 99/802, Reino Unido) em ADN de B19 - sangue total EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 10 IU/mL a 560 IU/mL. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração e Configuração PCR com o **ELiTe GALAXY** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%. Os resultados finais são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de sangue total e ELiTe GALAXY (IU/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	145 IU/mL	80 IU/mL	562 IU/mL

Limite de deteção para amostras de sangue total e ELiTe GALAXY (cópias/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	177 cópias/mL	98 cópias/mL	685 cópias/mL

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de plasma e o «**ELiTe GALAXY**» foi verificada com um painel de diluições de Parvovirus B19 dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da "2.ª Norma internacional da OMS para para ADN de Parvovirus B19 para ensaio de amplificação de ácido nucleico (NAT)" (NIBSC ref. 99/802, Reino Unido) em ADN Parvovirus B19 - plasma em EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 10 IU/mL a 560 IU/mL. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração e Configuração PCR com o **ELiTe GALAXY** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%. Os resultados finais são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de plasma e ELiTe GALAXY (IU/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	79 IU/mL	54 IU/mL	174 IU/mL

Limite de deteção para amostras de plasma e ELiTe GALAXY (cópias/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	91 cópias/mL	62 cópias/mL	200 cópias/mL

Sensibilidade analítica: intervalo de medição linear

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

A sensibilidade analítica deste ensaio, enquanto intervalo de medição linear, foi determinada com recurso a um painel de diluições (1 registo entre uma diluição e a seguinte) de ADN plasmídico contendo o produto de amplificação, cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. As diluições de 10⁷ moléculas por reação a 10¹ moléculas por reação foram testadas em 9 réplicas através da realização da amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

A análise dos dados obtidos, realizada por regressão linear, demonstrou que o ensaio mostra uma resposta linear para todos os pontos do painel (coeficiente de correlação linear superior a 0,99).

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

O limite inferior do intervalo de medição linear foi definido a 10 moléculas por reação dentro de 1 algoritmo desde a concentração mais baixa do standard de amplificação Q - PCR Standard (10² moléculas/20 µL).

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

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

Os limites do intervalo de medição linear como IU/mL referentes ao kit de extração usado são calculados na página 33.

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 20,4% das quantidades medidas, dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas nos 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A precisão do ensaio, enquanto diferença entre a média dos resultados obtidos com várias réplicas de uma amostra dentro da mesma sessão e a concentração teórica da amostra, permitiu obter uma percentagem média de Imprecisão (% Imprec.) de cerca de 12,4% das quantidades medidas, dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas nos 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

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

Sensibilidade analítica: capacidade de reprodução com material de referência calibrado

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

Foram realizados testes utilizando como material de referência calibrado um painel de diluições de PVB19 dentro do limite de concentração (QCMD 2008 B19 Vírus EQA Panel, Qnostics Ltd, UK). Cada amostra do painel foi testada em duplicado através da realização de toda a análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Testes com materiais de referência calibrados				
Amostra	Consenso conc. vírus no ensaio comercial Log ₁₀ IU / mL	Desvio Padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios Log ₁₀ IU / mL
B1908-01	PVB19, 2,396	0,534	2/2	2,636
B1908-02	PVB19, 3,966	0,596	2/2	4,182
B1908-03	PVB19, 2,822	0,574	2/2	2,750
B1908-04	Negativo, NA	N/A	0/2	Não detetado
B1908-05	PVB19, 2,894	0,607	2/2	2,928
B1908-06	PVB19, 2,061	0,577	2/2	1,969
B1908-07	PVB19, 2,926	0,648	2/2	3,026
B1908-08	PVB19, 3,575	0,595	2/2	3,627

Todas as amostras foram detetadas corretamente. Todos os resultados quantitativos obtidos estão dentro do intervalo definido pelo ensaio comercial do Desvio padrão (DP) ± 1 do consenso.

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência calibrado um painel de diluições de PVB19 dentro do limite de concentração (QCMD 2012 B19 Vírus EQA Panel, Qnostics Ltd, UK). Cada amostra foi testada em duplicados através da realização de todo o procedimento de análise: extração com **ELITE STAR** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

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

Testes com materiais de referência calibrados e o ELITE STAR				
Amostra	Consenso conc. vírus no ensaio comercial Log ₁₀ IU / mL	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios Log ₁₀ IU / mL
B1912-01	PVB19, 1,684	0,488	2/2	2,242
B1912-02	PVB19, 3,716	0,522	2/2	4,078
B1912-03	Negativo, NA	-	0/2	-
B1912-04	PVB19, 6,378	0,686	2/2	6,675
B1912-05	PVB19, 4,486	0,641	2/2	4,849
B1912-06	PVB19, 2,687	0,577	1/2	2,837
B1912-07	PVB19, 5,565	0,487	2/2	5,639
B1912-08	PVB19, 2,704	0,386	2/2	2,839

Todas as amostras foram detetadas corretamente. Seis (6) em sete amostras positivas foram quantificadas dentro do intervalo definido pelo consenso ± 1 DP e uma amostra (B1912-01) foi quantificada dentro do ± 2 SD. Este resultado pode explicar-se pelo facto de o título de amostra estar abaixo do limite de deteção do sistema.

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência calibrado um painel de diluições de PVB19 dentro do limite de concentração (QCMD 2014 B19 Vírus EQA Panel, Qnostics Ltd, UK). Cada amostra do painel foi testada em duplicado através da realização de todo o procedimento de análise, extração e Configuração PCR com o sistema **ELITE GALAXY** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

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

Testes com materiais de referência calibrados e o ELITE GALAXY				
Amostra	Consenso conc. vírus nos ensaios comerciais Log ₁₀ IU / mL	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios Log ₁₀ IU / mL
B19DNA14-01	PVB19, 4,788	0,507	2/2	4,977
B19DNA14-02	PVB19, 2,878	0,437	2/2	3,115
B19DNA14-03	PVB19, 4,848	0,400	2/2	4,848
B19DNA14-04	Negativo, NA	-	0/2	-
B19DNA14-05	PVB19, 5,802	0,465	2/2	5,996
B19DNA14-06	PVB19, 1,936	0,672	2/2	1,653
B19DNA14-07	PVB19, 3,913	0,371	2/2	3,972
B19DNA14-08	PVB19, 3,844	0,507	2/2	4,555

Todas as amostras foram detetadas corretamente. Seis (6) em sete amostras positivas foram quantificadas dentro do intervalo definido pelo consenso ± 1 DP e uma amostra (B19DNA14-08) foi quantificada dentro do ± 2 SD.

Sensibilidade analítica: Fator de conversão para unidades internacionais

Sangue total colhido em EDTA

O fator de conversão foi determinado utilizando um painel de três diluições (0,5 log₁₀ passo de diluição) de material de referência calibrado aprovado pela OMS ("2.ª Norma internacional da OMS para para ADN de Parvovirus B19 para ensaio de amplificação de ácido nucleico (NAT)", NIBSC ref. 99/802, Reino Unido) em sangue total colhido em EDTA.

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

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

A análise dos dados obtidos permite calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 0,9 IU por cópia de PVB19 detetada com amostras de sangue total. Os resultados são indicados na tabela seguinte.

Conversão para unidades internacionais com sangue total e ELiTe STAR				
Fc = 0,98 IU/cópia				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registo ₁₀	Quantidade média cópias/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registo ₁₀
31,623	4,500	29,023	28,434	4,443
10,000	4,000	9,631	9,435	3,947
3,162	3,500	4,346	4,258	3,607

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

A análise dos dados obtidos permite calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 0,8 IU por cópia de PVB19 detetado com amostras de sangue total. Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Conversão para unidades internacionais com sangue total e ELiTe GALAXY				
Fc = 0,82 IU/cópia				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registo ₁₀	Quantidade média cópias/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registo ₁₀
31,623	4,500	48,688	39,924	4,471
10,000	4,000	13,885	11,386	4,029
3,162	3,500	6,085	4,990	3,506

Plasma colhido em EDTA

O fator de conversão foi determinado utilizando um painel de três diluições (0,5 log₁₀ passo de diluição) de material de referência calibrado aprovado pela OMS ("2.ª Norma internacional da OMS para para ADN de Parvovirus B19 para ensaio de amplificação de ácido nucleico (NAT)", NIBSC ref. 99/802, Reino Unido) em plasma colhido em EDTA.

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

A análise dos dados obtidos permitiu calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 0,6 IU por cópia de PVB19 detetado com amostras de **plasma**. Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Conversão para Unidades internacionais com plasma e ELiTe STAR				
Fc = 0,69 IU/cópia				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registo ₁₀	Quantidade média cópias/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registo ₁₀
31,623	4,500	39,888	27,403	4,425
10,000	4,000	14,901	10,237	3,987
3,162	3,500	5,862	4,027	3,588

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

A análise dos dados obtidos permite calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 0,8 IU por cópias de PVB19 detetado com amostras de plasma. Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Conversão para Unidades internacionais com plasma e ELiTe GALAXY				
Fc = 0,87 IU/cópia				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registo ₁₀	Quantidade média cópias/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registo ₁₀
31,623	4,500	30,768	26,768	4,423
10,000	4,000	15,154	13,184	4,119
3,162	3,500	3,378	2,939	3,458

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

O fator de conversão médio a ser usado com este ensaio em associação com os sistemas de extração «**NucliSENS® easyMAG®**» ou «**QIASymphony® SP/AS**» para converter um resultado quantitativo de cópias/mL para unidades internacionais/mL foi definido para equivalente a 1 IU para a cópia de ADN do alvo.

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

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

A análise das regiões escolhidas para a hibridização dos primários e da sonda fluorescente no alinhamento das sequências disponíveis na base de dados para a região VP1 do PVB19, incluindo os genótipos 1, 2, 3a e 3b, revelou a respetiva conservação e ausência de mutações significativas.

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como eficiência de deteção e quantificação em diferentes genótipos/subtipos, foi verificada usando algumas construções plasmídicas correspondentes aos genótipos 1, 2 e 3a ou 3B.

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio foi verificada usando três plasmídeos contendo a sequência da região amplificada dos genótipos 1, 2 e 3 (o mesmo para os subtipos 3a e 3b). Os plasmídeos foram diluídos a partir de 105 cópias por reação para 102 cópias por reação. Estas amostras foram testadas em três réplicas a realizarem a amplificação por produtos ELiTechGroup S.p.A.. Os resultados estão resumidos na tabela seguinte:

Testes com plasmídeos correspondentes ao genótipo 1, genótipo 2, genótipo 3				
Concentração esperada cópias / reação	Concentração esperada cópias/reação	Quantidade média detetada de genótipo 1 Log ₁₀ cópias/reação	Quantidade média detetada de genótipo 2 Log ₁₀ cópias/reação	Quantidade média detetada de genótipo 3 Log ₁₀ cópias/reação
100,000	5,000	5,013	4,882	4,849
10,000	4,000	4,009	3,910	3,862
1,000	3,000	3,024	2,911	2,848
100	2,000	2,037	2,026	1,921

Os resultados estão dentro do intervalo definido pelo valor esperado $\pm 0,2 \text{ Log}_{10}$.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada usando 30 amostras de plasma colhidas em EDTA e negativas para ADN de PVB19 que foram reforçadas para ADN de PVB19 adicionado amostra B1912-05, do painel QCMD 2012 B19 Virus EQA Panel (Qnostics Ltd, UK) e 30 amostras de sangue total colhidas em EDTA e negativas para ADN de PVB19, que foram reforçadas para ADN de PVB19 adicionando uma amostra de B1912-05, do painel QCMD 2012 B19 Virus EQA Panel (Qnostics Ltd, UK). Cada amostra foi usada para realizar o procedimento de análise inteiro: extração com o sistema **ELiTe STAR** e amplificação com os produtos ELiTechGroup S.p.A. Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA reforçado para ADN de PVB19	30	30	0
Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de PVB19	30	30	0

Todas as amostras reforçadas foram corretamente detetadas como positivas para ADN de PVB19.

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

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 30 amostras de plasma negativas para ADN de Parvovirus B19, que foram reforçadas para ADN de Parvovirus B19 com adição da amostra B1912-05, a partir do Painel QCMD 2012 B19 Virus EQA Panel (Qnostics Ltd, UK) e 30 amostras de sangue total negativas para ADN de Parvovirus B19, que foram reforçadas para ADN de Adenovirus com adição da amostra B1912-05, a partir do Painel QCMD 2012 B19 Virus EQA Panel (Qnostics Ltd, UK). Cada amostra foi usada para a realização de todo o procedimento de análise: extração e Configuração PCR com o sistema **ELiTe GALAXY** e amplificação com produtos ELiTechGroup S.p.A. Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA reforçado para ADN de Parvovirus B19	30	30	0
Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de Parvovirus B19	30	30	0

Todas as amostras reforçadas foram corretamente detetadas como positivas para ADN de PVB19. A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 100%.

Especificidade analítica: ausência de marcadores potencialmente interferentes de reatividade cruzada

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

A análise do alinhamento das sequências dos primários e da sonda fluorescente com as sequências disponíveis nas bases de dados para organismos diferentes do PVB19, incluindo os genomas completos de Parvovirus 4, Bocavirus e Dependovirus, os vírus humanos que mais semelhantes ao PVB19, 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 PVB19 e positivas para ADN de outros patogénicos.

A especificidade analítica foi verificada utilizando como material de referência 22 amostras de sangue total (periférico) colhido em EDTA, que foram negativas para ADN de PVB19 mas positivas para ADN de outros patogénicos como PVB19, EBV, CMV, VZV, HSV1 e HHV8 (testadas com produtos de amplificação CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, com produtos ELiTechGroup S.p.A. Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA negativo para ADN de PVB19 e positivo para ADN de outros agentes patogénicos	22	0	22

Não foi detetada qualquer reatividade cruzada com amostras positivas para ADN de outros patogénicos.

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi testada com recurso a algumas amostras clínicas negativas de ADB de PVB19 de sangue total colhidas em EDTA, com testes negativos para ADN de PVB19.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 30 amostras de plasma colhido em EDTA que foram negativas para ADN de PVB19 e 30 amostras de sangue total colhido em EDTA que foram negativas para ADN de PVB19

(testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi usada para realização de todo o procedimento de análise: extração com **ELiTe STAR** e amplificação com produtos ELiTechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA e negativo para ADN de PVB19	30	0	30
Plasma colhido em EDTA negativo para ADN de PVB19	30	0	30

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

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 34 amostras de plasma colhido em EDTA que foram negativas para ADN de Parvovirus B19 e 34 amostras de sangue total colhido em EDTA que foram negativas para ADN de Parvovirus B19 (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi usada para a realização de todo o procedimento de análise: extração e Configuração PCR com o **ELiTe GALAXY** e amplificação com produtos ELiTechGroup S.p.A.

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Plasma colhido em EDTA e presumivelmente negativo para ADN de Parvovirus B19	34	0	34
Sangue total colhido em EDTA presumivelmente negativo para ADN de Parvovirus B19	33	1	32

Uma amostra de sangue total resultou num discrepante positivo (31 cópias/mL). Este título da amostra está abaixo do limite de deteção do método. A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 98,5%.

NOTA: 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 "Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit", FTP RTS070PLD.

REFERÊNCIAS

F. McOmish et al. (1993) *J. Clin. Microbiol.* **31**: 323 - 328
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**: e30
K. Linnet et al. (2004) *Clin. Chem.* **50**: 732 - 740.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Utilize este produto apenas com as seguintes amostras clínicas: sangue total (periférico e da medula óssea) colhido em EDTA, plasma colhido em EDTA e líquido amniótico.

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

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

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

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

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

Devido à sua elevada sensibilidade analítica, o método de PCR em tempo real usado neste produto é sensível a contaminação a partir de amostras clínicas positivas, dos positive controls 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 ARN do alvo não foi detetado no ARN

extraído da amostra; no entanto, não pode negligenciar-se o facto de o ARN do alvo ter um título mais baixo que o limite de deteção do produto (Ver “Características de desempenho”). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

Os resultados obtidos com este produto podem, por vezes, ser inválidos devido a uma falha do controlo interno. Neste caso, a amostra deve ser retestada, começando pela extração; o que pode causar 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.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

ELiTe InGenius e ELiTe BeGenius

Reação do Q-PCR Standard, curva standard ou reação do Controlo Positivo inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da Mistura de PCR, dos Q-PCR Standards e do Positive Control. Verifique os volumes da Mistura PCR, dos Q-PCR Standards e do Positive Control.
Degradação da PCR Mix.	Não use a PCR Mix durante mais de 7 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 Positive Control.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELiTechGroup.

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 da 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.

Reação da amostra inválida

Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da Mistura de PCR, do Controlo Interno e da amostra. Verifique os volumes da PCR Mix, do controlo Interno e da amostra.
Degradação da PCR Mix.	Não use a PCR Mix durante mais de 7 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 do Controlo Interno.	Utilize uma nova alíquota de Controlo Interno.

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

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" (Extractir + PCR).
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

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.

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 de 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" (Extractir + PCR).

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

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
reagente para PCR em tempo real do ADN

REF RTS070PLD

Plataforma aberta:

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

ADN alvo detetado na reação de Negative Control	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	Evite derramar o conteúdo do tubo de teste da amostra. Mude sempre as pontas entre uma amostra e a outra. Tenha cuidado quando distribuir amostras, controlos negativos, controlos positivos ou standards para os furos da microplaca e cumpra a ficha de trabalho.
Erro durante a definição do instrumento	Verifique as definições de posição das amostras, dos negative controls, positive controls ou 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.
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.

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

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

SÍMBOLOS

- REF** Número de catálogo.
-  Limite máximo da temperatura.
- LOT** Código de lote.
-  Prazo de validade (último dia do mês).
- IVD** Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*.
- CE** Cumprimento dos requisitos da Diretiva Europeia 98/79/CE relativa a dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*.
-  Contém suficiente para "N" testes.
- UDI** Identificação única do dispositivo
-  Atenção, consulte as instruções de utilização.
- CONT** Conteúdo.
-  Manter afastado da luz solar.
-  Fabricante.

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 EG 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, 7381818, 7541454, 7671218, 7718374, 7723038, 7759126, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529 e números de patente EP 1687609, 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 bem como pedidos que estejam atualmente pendentes.

As tecnologias ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® estão protegidas por patentes e aplicações 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.

MGB® Eclipse Dark Quencher®, AquaPhluor®, ELITe MGB®, o logotipo "ELITe MGB®", ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® são marcas comerciais registadas da ELITechGroup na União Europeia.

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

QIASymphony® é uma marca comercial registada da QIAGEN GmbH.

Ficol® é uma marca comercial registada da GE Healthcare Bio-Sciences AB.