



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

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

NOTICE of CHANGE dated 06/12/2022

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«Adenovirus ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTS078PLD

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

- *Update of LoD and LloQ for whole blood and plasma*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE



LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT



THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT



CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT



LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT



A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT



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



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

REF RTS078PLD



INDICE

UTILIZAÇÃO PREVISTA	página 2
PRINCÍPIOS DO ENSAIO	página 2
DESCRIÇÃO DO PRODUTO	página 3
MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO	página 3
MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO	página 3
OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS	página 3
AVISOS E PRECAUÇÕES	página 5
ELITE INGENIUS®	página 6
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 6
PROCEDIMENTO	página 7
ELITE BEGENIUS®	página 14
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 14
PROCEDIMENTO	página 16
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DO ELITE INGENIUS® E ELITE BEGENIUS®	página 21
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System	página 31
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 31
PROCEDIMENTO	página 33
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	página 41
Roche cobas z 480 analyzer	página 47
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 47
PROCEDIMENTO	página 48
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	página 53
REFERÊNCIAS	página 55
LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	página 55
RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	página 56
SÍMBOLOS	página 59
NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	página 60

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

REF RTS078PLD

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto «ADENOVIRUS ELITE MGB® Kit» faz parte de um ensaio qualitativo e quantitativo de amplificação de ácidos nucleicos para a **deteção e quantificação do ADN do Adenovírus humano (ADV)**, genótipos A, B, C, D, E, F e G (incluindo 57 serotipos), em amostras de ADN extraídas de sangue total colhido em EDTA, plasma colhido em EDTA, lavagens nasais e esfregaços nasais.

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

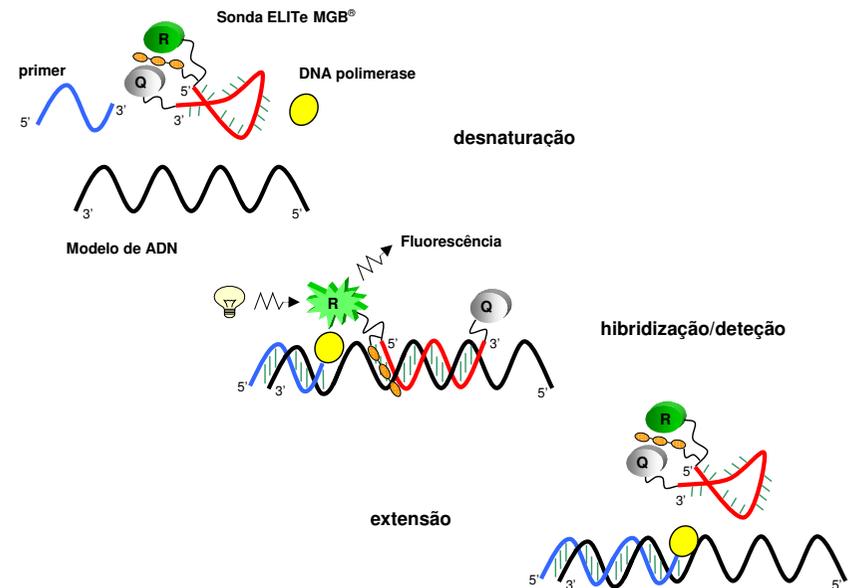
PRINCÍPIOS DO ENSAIO

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

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

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

Na imagem seguinte é sinteticamente mostrado o mecanismo de ativação e a emissão de fluorescência da sonda da tecnologia ELITE MGB®.



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

REF RTS078PLD

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto «**ADENOVIRUS ELITE MGB® Kit**» fornece a mistura completa **pronta a usar** Mistura ADV Q-PCR para amplificação em tempo real numa solução de estabilização, **aliquotada em quatro tubos de teste descartáveis**. Cada tubo contém **540 µL** de solução, suficiente para **24 testes** em associação com os sistemas «**ELITE InGenius®**» e «**ELITE BeGenius®**» e **25 testes** em associação com outros sistemas.

Os primers e a sonda específica do ADV (estabilizado pelo grupo MGB®, etiquetado com fluoróforo FAM e extinto por uma molécula não fluorescente) são específicos para uma região do gene da proteína **Hexon** do ADV.

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

A mistura de reação fornece tampão, cloreto de magnésio, trifosfatos nucleótidos, fluoróforo AP593, usado em vez de ROX ou CY5 como referência passiva para normalização da fluorescência, a enzima Uracil-N-glicosidase (UNG) para inativar a contaminação pelo produto de amplificação, a enzima de polimerase de ADN de "arranque a quente".

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

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

MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

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

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- Câmara de fluxo laminar.
- Luvas de nitrilo sem pó descartáveis ou material semelhante.
- Misturador de vórtice.
- Microcentrifugadora de bancada (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas e pontas esterilizadas com filtro de aerossóis ou pontas esterilizadas de deslocação positiva (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Água de grau de biologia molecular.
- Termóstato programável com sistema ótico de deteção de fluorescência 7300 Real Time PCR System ou 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument calibrado de acordo com as instruções do fabricante.
- Termóstato programável com sistema ótico de deteção de fluorescência, analisador cobas z 480, calibrado de acordo com as instruções do fabricante..

OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

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

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

REF RTS078PLD

Para uma extração de ADN automática, a amplificação e a interpretação da análise da amostra com o instrumento «**ELITE InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) são necessários os seguintes produtos genéricos: os cartuchos de extração «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200), os consumíveis para extração e amplificação de ácidos nucleicos a partir de amostras biológicas «**Conjunto de consumíveis ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032CS), «**Caixa de desperdícios ELITE InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., ref. F2102-000), «**Cassete de PCR ELITE InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT035PCR) e «**Pontas de filtro universais 300 µL**» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, ref. TF-350-L-R-S).

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

- para os calibradores «**ADV ELITE_STD**»,
- para o Positive Control da amplificação «**ADV ELITE_PC**»,
- para o Negative Control da amplificação «**ADV ELITE_NC**»,
- para análise das amostras «**ADV ELITE_WB_200_100**» e «**ADV ELITE_PL_200_100**»

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

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

- para os calibradores «**ADV ELITE_Be_STD**»,
- para o Positive Control da amplificação «**ADV ELITE_Be_PC**»,
- para o Negative Control da amplificação «**ADV ELITE_Be_NC**»,
- para análise das amostras «**ADV ELITE_Be_WB_200_100**» e «**ADV ELITE_Be_PL_200_100**».

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

Para extração de ADN automática e preparação de microplacas para amplificação de amostras a serem analisadas, é validada a utilização do produto genérico «**ELITE GALAXY 300 Extraction Kit**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT021EX), kit para extração do ADN e ARN de amostras não celulares e celulares com o instrumento «**ELITE GALAXY**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT020). O instrumento «**ELITE GALAXY**» também pode realizar a Configuração PCR.

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

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

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

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

REF RTS078PLD

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

Quando for usado um 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, é necessário o uso do produto genérico: «**MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL**» (Life Technologies, ref. 4346906), microplacas com furos de 0,1 mL e folhas vedantes adesivas para amplificação em tempo real.

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

Se for necessária a detecção de ADN de ADV para análise qualitativa, use o produto «**Controlo positivo ADENOVIRUS - ELITE**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR078PLD) ou o produto «**RF de controlo positivo ADENOVIRUS - ELITE**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR078PLD-R), controlo positivo de ADN de plasmídeo.

Se for necessária a detecção e quantificação de ADN de ADV para análise quantitativa, use o produto «**ADENOVIRUS ELITE Standard**» (ELITechGroup S.p.A., ref. STD078PLD), quatro diluições de ADN de plasmídeo em quantidade conhecida para obter a curva padrão.

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

AVISOS E PRECAUÇÕES

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

Avisos e precauções gerais

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

Manuseie e elimine todos os reagentes e todos os materiais usados na realização do ensaio como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite o contacto direto com os reagentes. Evite salpicos ou vaporizações. Os desperdícios devem ser manuseados e eliminados em conformidade com as normas de segurança adequadas. Os materiais combustíveis descartáveis devem ser incinerados. Os desperdícios líquidos que contenham ácidos ou bases devem ser neutralizados antes da eliminação.

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

Nunca deve pipetar soluções com a boca.

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

Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.

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

Leia atentamente todas as instruções fornecidas no produto antes de efetuar o ensaio.

Durante a realização do ensaio, siga as instruções fornecidas no produto.

Não utilize o produto após a data de validade indicada.

Use apenas os reagentes fornecidos no produto e os recomendados pelo fabricante.

Não use reagentes de lotes diferentes.

Não use reagentes de outros fabricantes.

Avisos e precauções para biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular, como a extração, amplificação e detecção de ácidos nucleicos, requerem colaboradores qualificados e com formação, para evitar o risco de resultados incorretos, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos contidos nas amostras ou à contaminação da amostra por produtos de amplificação.

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

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

REF RTS078PLD

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

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

Os reagentes devem ser manuseados sob uma câmara de fluxo laminar. Os reagentes necessários para a amplificação devem ser preparados de forma a que possam ser usados numa sessão única. As pipetas usadas no manuseamento dos reagentes devem ser usadas exclusivamente para este fim. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

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

Avisos e precauções específicos para os componentes

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

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

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

ELITE InGenius®

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

O produto deve ser utilizado com as amostras clínicas:

Sangue total colhido em EDTA

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

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

Nota: quando a extração de ADN de sangue total for realizada com o **ELITE InGenius** e com o **Software ELITE InGenius versão 1.3** (ou versões equivalentes mais recentes), use o protocolo de extração **ADV ELITE_WB_200_100**. Estes protocolos processam 200 µL da amostra, adicionam o Controlo Interno **CPE** a 10 µL por extração e eluem os ácidos nucleicos em 100 µL.

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

Plasma colhido em EDTA

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

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

REF RTS078PLD

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

Nota: quando a extração de ADN de 200 µL de plasma for realizada com o **ELITE InGenius** e com o **Software ELITE InGenius** versão 1.3 (ou versões equivalentes mais recentes), use o protocolo de extração **ADV ELITE_PL_200_100**. Estes protocolos processam 200 µL da amostra, adicionam o Controlo Interno **CPE** a 10 µL por extração e eluem os ácidos nucleicos em 100 µL.

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

Outras amostras

Não existem dados disponíveis relativos aos desempenhos do produto com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: lavagens nasais, zaragatoas, sobrenadante fecal e líquido cefalorraquidiano.

Substâncias interferentes

O ADN extraído das amostra não deve conter heparina, para evitar problemas de inibição e a possibilidade de resultados inválidos frequentes.

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

Calibradores da amplificação e controlos da amplificação

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

- como definição do calibrador, utilize os quatro níveis de concentração do **ADENOVIRUS ELITE Standard**, em associação com o protocolo «**ADV ELITE_STD**»,
- como controlo positivo da amplificação, use o **ADENOVIRUS - ELITE Positive Control**, em associação com o protocolo «**ADV ELITE_PC**»,
- como negative control da amplificação, use água de qualidade para biologia molecular (não fornecida com este kit) em associação com o protocolo «**ADV ELITE_NC**»,

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

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

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

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

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

PROCEDIMENTO DO ELITE InGenius®

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

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

Verificação da prontidão do sistema

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

- ligar o **ELITE InGenius** e selecionar o modo “**CLOSED**” (Fechado);
- verificar se os Calibradores (**ADV Q-PCR Standard**) foram executados, aprovados e não estão

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

REF RTS078PLD

expirados (estado). Pode verificar esta situação no menu “Calibração” na página inicial;

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

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

Protocolo de ensaio para o ADENOVIRUS ELITE MGB Kit e o ELITE InGenius			
Nome	Matriz	Unidade do relatório	Características
ADV ELITE_WB_200_100	Sangue Total	cópias/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo Interno: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
ADV ELITE_PL_200_100	Plasma	cópias/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo Interno: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

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

Os protocolos para análise qualitativa estão disponíveis a pedido.

Preparação da sessão

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

- Execução integrada (Extração + PCR)
- Execução de amplificação (PCR Only) (apenas PCR)
- Execução da calibração (PCR Only) (apenas PCR),
- Execução de Positive e/ou Negative Control da amplificação (PCR Only)

O perfil térmico da amplificação está incluído nos protocolos de ensaio disponíveis com o instrumento e é automaticamente recuperado quando o protocolo de ensaio for selecionado.

Nota: o sistema **ELITE InGenius** pode ser ligado ao “Location Information Server” (Servidor de informação da localização - LIS) através do qual é possível enviar a informação da sessão de trabalho. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

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

A. Execução integrada

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

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

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

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

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

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

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

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

B. Execução da amplificação

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

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

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

2. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".

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

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

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

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

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

C. Execução de calibração

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

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

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

2. Descongele os tubos ADV Q - PCR Standard (Cal1: ADV Q-PCR Standards 10², Cal2: ADV Q-PCR Standards 10³, Cal3: ADV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: ADV Q-PCR Standards 10⁵) à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
4. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Volume de entrada de extração" é 200 µL para processar 200 µL da amostra e certifique-se de que o Volume de eluição extraído é 100 µL.
5. Começando a partir do Rastreo de interesse, selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (ADV ELITE_STD) e preencha com o número do lote e a data de expiração para o ADV Q - PCR Standard. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.

- Carregue a Mistura ADV Q-PCR no “Bloco de inventário” selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em “Next” para continuar a preparação.
- Carregue e verifique os Suportes de pontas na “Inventory Area” (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em “Next” para continuar a preparação.
- Carregue os tubos **ADV Q-PCR Standard** e a “PCR Cassette” no instrumento seguindo as instruções na GUI. Clique em “Next” para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione “Start” para iniciar a execução.

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

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

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

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

D. Execução de amplificação para Positive Control e Negative Control

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

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

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

- Descongele ADV - ELITE Positive Control à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos para a amplificação do controlo positivo. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Transfira pelo menos 50 µL da água de qualidade para biologia molecular para as sessões num tubo Eluição, fornecido com o Conjunto de consumíveis ELITE InGenius® SP.
- Selecione “Perform Run” a partir do ecrã “Home screen”.
- Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o Volume de entrada da extração: 200 µL para processar 200 µL da amostra e certifique-se de que o Volume de eluição extraído é 100 µL.
- Para o controlo positivo, selecione ADV ELITE_PC e preencha o número do lote e a data de validade do ADV Positive Control.
- Para o controlo negativo, selecione ADV ELITE_NC e preencha o número do lote e a data de validade da água de qualidade para biologia molecular.
- Clique em “Next” para continuar a preparação.
- Carregue a Mistura ADV Q-PCR no “Bloco de inventário” selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em “Next” para continuar a preparação.
- Carregue e verifique os Suportes de pontas na “Inventory Area” (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em “Next” para continuar a preparação.
- Carregue a Cassete PCR da amplificação, o tubo de Positive Control de ADV e o tubo de Negative Control seguindo as instruções na GUI. Clique em “Next” para continuar a preparação.

- Feche a porta do instrumento.
- Pressione “Start” para iniciar a execução.

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

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

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

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

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

Revisão e aprovação de resultados

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

Nota: O sistema **ELITE InGenius** pode ser ligado ao “Location Information Server” (Servidor de informação da localização - LIS) através do qual é possível enviar os resultados da sessão de trabalho para o centro de dados do laboratório. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

O **ELITE InGenius** gera os resultados utilizando o «**ADENOVIRUS ELITE MGB® Kit**» através do seguinte procedimento:

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

A. Validação da Curva de calibração

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda ADV específica (“ADV”) nas reações de amplificação do Calibrador são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos no protocolo de ensaio “ADV ELITE_STD”.

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

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

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

Nota: Quando a Curva de calibração não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem “não passou” no menu “Calibração” e não é possível aprovar a mesma. Têm de ser repetidas as reações de amplificação do Calibrador.

Nota: Quando a Curva de calibração for executada em conjunto com amostras e o respetivo resultado for inválido, toda a sessão é inválida e deve ser repetida a amplificação de todas as amostras.

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

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda específica ADV (“ADV”) nas reações de amplificação de Controlo positivo e Controlo negativo são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos nos protocolos de ensaio “ADV ELITE_PC” e “ADV ELITE_NC”.

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

REF RTS078PLD

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

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

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

Nota: Quando o resultado do Controlo positivo ou Controlo negativo não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem "não passou" no menu "Controlos" e não é possível aprovar o mesmo. Tem de ser repetida a reação de amplificação do Controlo positivo ou Controlo negativo.

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

C. Validação dos resultados das amostras

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

Nota: Antes da análise de qualquer amostra, é obrigatório criar e aprovar a Curva de calibração e os Controlos de amplificação para o lote do reagente usado. É recomendado, mas opcional, executar o Positive e Negative Control em conjunto com os Calibradores. A disponibilidade de resultados da Curva de calibração e de Controlo positivo e negativo da amplificação com "Aprovado" (Estado) é mostrada nas janelas "Calibração" e "Controlos" da GUI.

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

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

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

Para cada amostra, o cálculo da carga viral é automaticamente realizado pelo **ELITE InGenius Software** como estabelecido pelo algoritmo e os parâmetros do protocolo de ensaio.

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

Resultado da execução da amostra	Interpretação
ADV: ADN detetado, quantidade igual a XXX cópias/mL	ADN ADV detetado no intervalo de medição do ensaio, quantidade como mostrado.
ADV: ADN detetado, quantidade inferior a LLoQ cópias/mL	ADN ADV detetado abaixo do limite inferior de quantificação do ensaio
ADV: ADN detetado, quantidade acima de ULoQ cópias/mL	ADN ADV detetado além do limite superior de quantificação do ensaio
ADV: ADN não detetado ou inferior a LoD cópias/mL	ADN ADV não detetado ou abaixo do limite de deteção do ensaio.
Inválido - Voltar a testar a amostra	Resultado do ensaio não válido devido a falha do Controlo Interno (falha na extração incorreta ou presença de inibidor).

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

REF RTS078PLD

As amostras não adequadas para análise são reportadas como "Inválido - Voltar a testar a amostra" pelo software ELITE InGenius. Neste caso, o ADN do Controlo Interno não foi detetado devido a potenciais problemas no passo de amplificação ou extração (degradação do ADN, perda de ADN durante a extração ou transferência de inibidores na eluição), que pode resultar em falsos negativos.

Quando o volume da eluição é suficiente, a amostra extraída pode ser novamente testada através de uma execução da amplificação no modo "PCR Only" (apenas PCR). No caso de um segundo resultado inválido, a amostra deve ser novamente testada começando a partir da extração de uma nova alíquota utilizando o modo "Extract + PCR".

As amostras adequadas para análise em que não foi possível detetar ADN ADV são reportadas como: "ADV: ADN não detetado ou inferior ao LoD". Neste caso não pode excluir-se que o ADN ADV está presente a uma concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver "desempenho e características").

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

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

D. Elaboração do relatório do resultado das amostras

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

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

O "Track Report" apresenta os detalhes de um rastreio de execução da amostra pelo rastreio selecionado.

O "Relatório da amostra" e o "Relatório do rastreio" podem ser impressos e assinados por pessoal autorizado

ELITE BeGenius®

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser utilizado com as seguintes amostras clínicas:

Sangue total colhido em EDTA

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

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

Nota: quando a extração de ADN do sangue total é realizada com o **ELITE BeGenius®** e com o **software do ELITE BeGenius® versão 2.1.0** (ou versões equivalentes posteriores), use o protocolo de extração **ADV ELITE_Be_WB_200_100** Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona controlo interno do **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

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

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

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

REF RTS078PLD

máximo de três dias, caso contrário, devem ser congeladas e guardadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

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

Nota: quando a extração de ADN a partir de 200 µL de plasma for realizada com o **ELITE BeGenius®** e o **software ELITE BeGenius®** versão **2.1.0** (ou versões posteriores equivalentes), utilize o protocolo de extração **ADV ELITE Be_PL_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o controle interno do **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Outras amostras:

Não existem dados disponíveis relativos aos desempenhos do produto com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: lavagens nasais, zaragatoas, sobrenadante fecal e líquido cefalorraquidiano.

Substâncias interferentes

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

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

Calibradores da amplificação e controles da amplificação

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

como definição do calibrador, utilize os quatro níveis de concentração do **ADENOVIRUS ELITE Standard**, em associação com o protocolo «**ADV ELITE Be_STD**»,
como positivo control da amplificação, use o **ADENOVIRUS - ELITE Positive Control** em associação com o protocolo «**ADV ELITE Be_PC**»,
como negative control da amplificação, use água de qualidade de biologia molecular (não fornecida com este kit) em associação com o protocolo «**ADV ELITE Be_NC**».

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

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

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

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

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

Controlos da qualidade

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

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

REF RTS078PLD

PROCEDIMENTO DO ELITE BeGenius®

O procedimento para utilização do «**ADENOVIRUS ELITE MGB Kit**» com o sistema **ELITE BeGenius** consiste em três passos:

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

Verificação da prontidão do sistema

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

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

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

Protocolos de ensaio para o «ADENOVIRUS ELITE MGB Kit» e o ELITE InGenius			
Nome	Matriz	Unidade do relatório	Características
ADV ELITE_Be_WB_200_100	Sangue Total	cópias/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo Interno: 10 µL Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
ADV ELITE_Be_PL_200_100	Plasma	cópias/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo Interno: 10 µL Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

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

Os protocolos para análise qualitativa estão disponíveis a pedido.

Preparação da sessão

O **ADENOVIRUS ELITE MGB Kit** em associação com o **ELITE BeGenius** pode ser usado para:

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

Todos os parâmetros necessários para a sessão estão incluídos no Protocolo de ensaio disponível no instrumento e são automaticamente recuperados quando o Protocolo de ensaio é selecionado.

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

REF RTS078PLD

Nota: O instrumento **ELITE BeGenius** pode ser ligado ao “Location Information Server” (Servidor de informação da localização - LIS) através do qual é possível carregar a informação da sessão de trabalho. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

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

A. Execução da amostra

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

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

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

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

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

8. Verifique o Volume de entrada de extração (200 µL) e o Volume de eluição extraído (100 µL).
9. Seleccione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna “Assay” (isto é, ADV ELITE_Be_WB_200_100). Clique em “Next” para continuar a preparação.
10. Se usado, repita os passos 7 a 9 para o Rack 4.
11. Carregue os tubos de eluato nos Racks 3 e 2 (comece sempre com o Rack 3).

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

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

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

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

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

REF RTS078PLD

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

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

B. Execução da amplificação

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

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

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

1. Selecione “Perform Run” a partir do ecrã “Home screen”.
2. Retire os Suportes 1, 2 e 3 da “Cooler Unit” e coloque-os na mesa de preparação.
3. Selecione o “run mode”: “PCR Only”.
4. Carregue as amostras nos Racks 3 e 2 (comece sempre com o Rack 3).
5. Insira o suporte na “Cooler Unit”. Clique em “Next” para continuar a preparação.
6. Mesmo que não seja efetuada a extração, verifique o Volume de entrada de extração (200 µL) e o Volume de eluição extraído (100 µL).
7. Seleccione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna “Assay” (por ex., ADV ELITE_Be_WB_200_100). Clique em “Next” para continuar a preparação.
8. Repita os passos 7 a 9 para o Rack 2.
9. Carregue a ADV Q-PCR Mix no Rack 1.
10. Insira o suporte na “Cooler Unit”. Clique em “Next” para continuar a preparação.
11. Carregue e verifique os Suportes de pontas na “Inventory Area” (Área de inventário) seguindo as instruções na GUI. Clique em “Next” para continuar a preparação.
12. Carregue o Cesto com “PCR Cassette” na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em “Next” para continuar a preparação.
13. Feche a porta do instrumento.
14. Pressione “Start” para iniciar a execução.

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

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

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

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

C. Execução de calibração

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

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

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

2. Descongele os tubos ADV Q - PCR Standard (Cal1: ADV Q-PCR Standards 10², Cal2: ADV Q-PCR Standards 10³, Cal3: ADV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: ADV Q-PCR Standards 10⁵) à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
4. Retire os Suportes 1, 2 e 3 da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
5. Selecione o "run mode": "PCR Only".
6. Carregue os tubos do Calibrador no Rack 3.
7. Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
8. Selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (ADV ELITE_Be_STD). Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue a ADV Q-PCR Mix no Rack 2.
10. Insira o Rack 2 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
12. Carregue o cesto com a "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
13. Feche a porta do instrumento.
14. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

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

D. Execução de Positive Control e Negative Control

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

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

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

2. Descongele ADV - ELITE Positive Control à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos para a amplificação do controlo positivo. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Transfira pelo menos 50 µL da água de qualidade para biologia molecular (como Negative Control) para as sessões num tubo Eluição, fornecido com o ELITE InGenius SP Consumable Set.
4. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
5. Retire os Suportes 1, 2 e 3 da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
6. Selecione o "run mode": "PCR Only".
7. Carregue os tubos de Positive Control e Negative Control no Rack 3.
8. Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
9. Selecione o protocolo de ensaio a utilizar "ADV ELITE_Be_PC" and "ADV ELITE_Be_NC" na coluna "Assay". Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue a ADV Q-PCR Mix no Rack 2.
11. Insira o Rack 2 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
12. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
13. Carregue o cesto com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
14. Feche a porta do instrumento.
15. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

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

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

REF RTS078PLD

Revisão e aprovação de resultados

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

Nota: O sistema **ELITE BeGenius** pode ser ligado ao "Location Information Server" (Servidor de informação da localização - LIS) através do qual é possível enviar os resultados da sessão de trabalho para o centro de dados do laboratório. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

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

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

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

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO
ELITE InGenius e ELITE BeGenius

Sensibilidade analítica: Limite de deteção

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

O LoD deste ensaio foi testado usando o ADN de plasmídeo que contém o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida pelo espetrofotómetro. O ADN de plasmídeo foi diluído a um título de 10 cópias/20 µL no ADN genómico humano a um título de 500 ng/20 µL. Esta amostra foi testada apenas com PCR em 24 réplicas a realizarem a amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. em dois instrumentos diferentes. Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

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

Sangue total

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de **Sangue Total** e o **ELITE InGenius** foi verificada com um painel de diluições de ADV dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da "1.ª Norma Internacional da OMS para ADN do adenovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (Código NIBSC: 16/324, Reino Unido), em ADN de ADV – matriz negativa. O painel era constituído por seis pontos à volta da concentração limite. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas realizando todo o procedimento de análise, preparação da execução, extração de ácidos nucleicos, amplificação em tempo real e interpretação de dados com o **ELITE InGenius** e produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

A sensibilidade analítica em cópias/mL é calculada através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 29.

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

REF RTS078PLD

Os resultados finais são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção com o ELITE InGenius			
Matriz	95% de positividade	intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
Sangue Total	117 IU/mL	76 IU/mL	296 IU/mL
	45 cópias/mL	29 cópias/mL	114 cópias/mL

O valor do LdD calculado para **Sangue Total** foi verificado em associação com o **ELITE InGenius** e o **ELITE BeGenius** através de testes a 20 réplicas de sangue total colhidas em EDTA reforçadas por material de referência certificado ADV ("1.ª Norma internacional da OMS, NIBSC) a uma concentração reivindicada. O LoD é confirmado se, pelo menos, 18 em 20 réplicas derem resultado positivo em conformidade com a norma CLSI EP17-A.

Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para sangue total e ELITE InGenius					
Amostra	Título	Alvo	N	Positivo	Negativo
Sangue total colhido em EDTA	117 IU/mL	ADV	20	20	0

Limite de deteção para amostras de sangue total e ELITE BeGenius					
Amostra	Título	Alvo	N	Positivo	Negativo
Sangue total colhido em EDTA	117 IU/mL	ADV	20	19	1

O valor do LdD para o alvo de ADV foi confirmado a 117 IU/mL em associação com amostras de sangue total.

Plasma:

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de **Plasma** e o **ELITE BeGenius** foi verificada com um painel de diluições de ADV dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da "1.ª Norma Internacional da OMS para ADN do adenovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (Código NIBSC: 16/324, Reino Unido), em ADN de ADV – matriz negativa. O painel era constituído por, pelo menos, seis pontos à volta da concentração limite. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas realizando todo o procedimento de análise, preparação da execução, extração de ácidos nucleicos, amplificação em tempo real e interpretação de dados com o **ELITE BeGenius** e produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

O valor em cópias/mL é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 29.

Os resultados finais são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção com o ELITE BeGenius			
Matriz	95% de positividade	intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
Plasma	89 IU/mL	60 IU/mL	204 IU/mL
	47 cópias/mL	32 cópias/mL	107 cópias/mL

O valor do LdD calculado para o **Plasma** foi verificado em associação com o **ELITE BeGenius** e o **ELITE InGenius** através de testes a 20 réplicas de plasma colhidas em EDTA reforçadas por material de referência certificado ADV ("1.ª Norma internacional da OMS, NIBSC) a uma concentração reivindicada. O LoD é confirmado se, pelo menos, 18 em 20 réplicas derem resultado positivo em conformidade com a norma CLSI EP17-A.

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

REF RTS078PLD

Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de detecção para o plasma e o ELITE BeGenius					
Amostra	Título	Alvo	N	Positivo	Negativo
Plasma colhido em EDTA	89 IU/mL	ADV	20	20	0

Limite de detecção para o plasma e o ELITE InGenius					
Amostra	Título	Alvo	N	Positivo	Negativo
Plasma colhido em EDTA	89 IU/mL	ADV	20	20	0

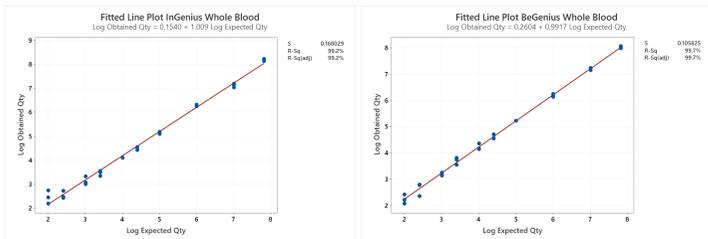
O valor do LdD para o alvo de ADV foi confirmado a 89 IU/mL em associação com o Plasma colhido em EDTA.

Intervalo de medição linear

Sangue Total:

O intervalo de medição linear do ADENOVIRUS ELITE MGB® Kit usado em associação com **Sangue Total** e o **ELITE InGenius** e o **ELITE BeGenius** foi testado usando um painel preparado através da diluição de material de referência ADV ("1ª Norma Internacional da OMS, NIBSC) em ADN de ADV - matriz negativa. O painel era constituído por dez pontos de diluição de $6,5 \times 10^7$ a 10^2 IU / mL. Cada amostra do painel foi testada em 3 réplicas.

A análise dos dados obtidos, realizada pela regressão linear, demonstrou que o ensaio, em associação com amostras de sangue total, mostra uma resposta linear para todos os níveis de diluição com um coeficiente de correlação quadrado (R2) igual a 0,992 para o **ELITE InGenius** e 0,997 para o **ELITE BeGenius**.



O Limite inferior de quantificação (LLoQ) foi definido à concentração que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,1978 Registro IU/mL para o ELITE InGenius e 0,2865 Registro IU/mL para o ELITE BeGenius) e exatos (Bias igual a 0,1627 Registro IU/mL para o ELITE InGenius e 0,0287 Registro IU/mL para o ELITE BeGenius): 117 IU/mL.

O Limite superior de quantificação (ULoQ) foi definido à concentração mais alta testada que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,0458 Registro IU/mL para o ELITE InGenius e 0,0358 Registro IU/mL para o ELITE BeGenius) e exatos (Bias igual a -0,3943 Registro IU/mL para o ELITE InGenius e -0,2099 Registro IU/mL para o ELITE BeGenius): 65.000.000 IU/mL.

O intervalo de medição linear como cópias/mL para sangue total é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 29.

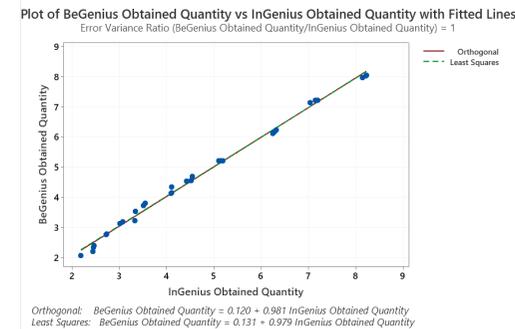
Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear para amostras de sangue total e o ELITE InGenius e ELITE BeGenius		
Unidade de medida	limite inferior	limite superior
IU/mL	117	65.000.000
cópias/mL	45	25.000.000

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

REF RTS078PLD

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

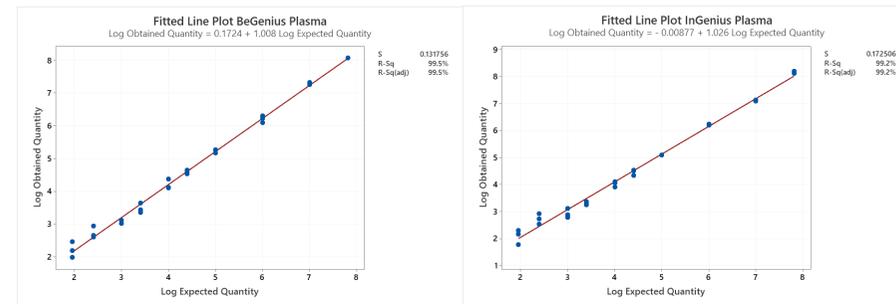


A análise da regressão ortogonal gerou um declive igual a 0,981 (95% CI: 0,955; 1,006) e uma interceção igual a 0,120 (95% CI: - 0,010; 0,249). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0,995.

Plasma:

O intervalo de medição linear do ADENOVIRUS ELITE MGB® Kit usado em associação com **Plasma** e o **ELITE InGenius** e o **ELITE BeGenius** foi testado usando um painel preparado através da diluição de material de referência ADV ("1ª Norma Internacional da OMS, NIBSC) em ADN de ADV - matriz negativa. O painel era constituído por dez pontos de diluição de $6,5 \times 10^7$ a 89 IU/mL. Cada amostra do painel foi testada em 3 réplicas.

A análise dos dados obtidos, realizada por análise da regressão linear demonstrou que o ensaio, em associação com amostras de plasma, mostra uma resposta linear para todas as diluições com um coeficiente de correlação quadrado (R2) igual a 0,995 para o **ELITE BeGenius** e 0,992 para o **ELITE InGenius**.



O Limite inferior de quantificação (LLoQ) foi definido à concentração do LoD que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,2738 Registro IU/mL para o ELITE InGenius e 0,2535 Registro IU/mL para o ELITE BeGenius) e exatos (Bias igual a -0,0397 Registro IU/mL para o ELITE InGenius e -0,0521 Registro IU/mL para o ELITE BeGenius): 89 IU/mL.

O Limite superior de quantificação (ULoQ) foi definido à concentração mais alta testada que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,0515 Registro IU/mL para o ELITE InGenius e 0,0015 Registro IU/mL para o ELITE BeGenius) e exatos (Bias igual a 0,3222 Registro IU/mL para o ELITE InGenius e 0,2488 Registro IU/mL para o ELITE BeGenius): 65.000.001 IU/mL.

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

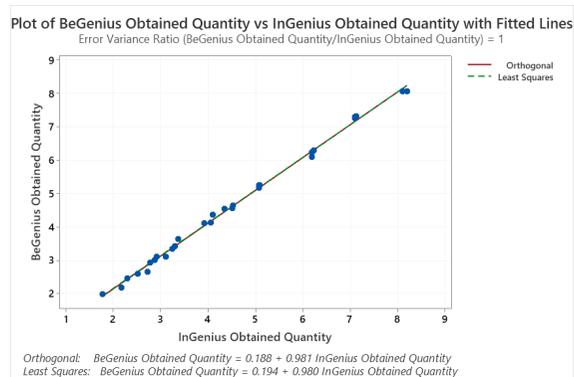
REF RTS078PLD

O intervalo de medição linear como cópias/mL para Plasma é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 29.

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear para amostras de plasma e o ELITE InGenius e ELITE BeGenius		
Unidade de medida	limite inferior	limite superior
IU/mL	89	65.000.001
cópias/mL	47	34.210.527

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



Neste teste, a análise da regressão ortogonal gerou um declive igual a 0,981 (95% CI: 0,962 - 1,000) e uma interceção igual a 0,188 (95% CI: 0,094 - 0,282). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0,994.

Repetibilidade

A Repetibilidade dos resultados obtidos pelo produto ADENOVIRUS ELITE MGB Kit em associação com os sistemas **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** foi testada através da análise de um painel de amostras de Sangue total colhido em EDTA. O painel incluiu uma amostra negativa e duas amostras reforçadas com material de referência certificado ADV ("1.ª Norma internacional da OMS para ADN de adenovírus humano, para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (código NIBSC 16/324, Reino Unido) a uma concentração de 3 x LdD (cerca de 354 IU/mL) e de 10 x LdD (cerca de 1180 IU/mL).

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

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

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

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

REF RTS078PLD

Nas tabelas seguintes é apresentado um resumo dos resultados.

Amostra	Repetibilidade intra-sessão ELITE InGenius							
	ADV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	25,20	0,44	1,73
3 x LoD	8 / 8	35,58	0,51	1,43				
10 x LoD	8 / 8	34,09	0,49	1,44				

Amostra	Repetibilidade inter-sessão ELITE InGenius							
	ADV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	48 / 48	25,14	0,45	1,80
3 x LoD	16 / 16	35,67	0,55	1,53				
10 x LoD	16 / 16	34,05	0,42	1,23				

No teste da Repetibilidade no **ELITE InGenius**, o ensaio detetou o ADV alvo como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores Ct que não excederam 1,5% para ADV e 1,8% para o Controlo Interno.

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

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

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

Nas tabelas seguintes é apresentado um resumo dos resultados.

Amostra	Repetibilidade intra-sessão ELITE BeGenius							
	ADV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	27,33	0,44	1,62
3 x LoD	8 / 8	36,72	0,38	1,03				
10 x LoD	8 / 8	34,99	0,28	0,80				

Amostra	Repetibilidade inter-sessão ELITE BeGenius							
	ADV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	47 / 47	27,13	0,48	1,77
3 x LoD	15 / 15	36,61	0,40	1,10				
10 x LoD	16 / 16	34,90	0,31	0,88				

No teste da Repetibilidade no **ELITE BeGenius**, o ensaio detetou o ADV alvo como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores Ct que não excederam 1,1% para ADV e 1,8% para o Controlo Interno.

Reprodutibilidade

A Reprodutibilidade dos resultados obtidos pelo produto ADENOVIRUS ELITE MGB Kit em associação com os sistemas **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** foi testada através da análise de um painel de amostras de sangue total. O painel incluiu uma amostra negativa e duas amostras reforçadas com material de referência certificado PVB19 ("3.ª Norma internacional HBV da OMS para Parvovírus B19 para técnicas de amplificação de ácido nucleico", código NIBSC 16/324, Reino Unido) a uma concentração de 3 x

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

REF RTS078PLD

LdD (cerca de 354 IU/mL) e de 10 x LdD (cerca de 1180 IU/mL).

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

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

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

Na tabela seguinte é apresentado um resumo dos resultados.

Capacidade de reprodução inter-instrumento ELITE InGenius								
Amostra	ADV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	24,48	0,59	2,43
3 x LoD	8 / 8	35,91	0,67	1,87				
10 x LoD	8 / 8	34,42	0,39	1,13				

Repetibilidade interlote ELITE InGenius								
Amostra	ADV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	24,44	0,82	3,35
3 x LoD	8 / 8	35,85	0,45	1,25				
10 x LoD	8 / 8	34,34	0,50	1,45				

No teste da Capacidade de reprodução no **ELITE InGenius**, o ensaio detetou o ADV alvo como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores Ct que não excederam 1,9% para ADV e 3,4% para o Controlo Interno.

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

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

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

Na tabela seguinte é apresentado um resumo dos resultados.

Capacidade de reprodução inter-instrumento ELITE BeGenius								
Amostra	ADV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	27,76	0,83	2,98
3 x LoD	8 / 8	37,72	0,97	2,58				
10 x LoD	8 / 8	36,17	0,91	2,51				

Repetibilidade interlote ELITE BeGenius								
Amostra	ADV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	26,81	0,57	2,12
3 x LoD	8 / 8	37,09	0,60	1,62				
10 x LoD	8 / 8	35,38	0,32	0,92				

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

REF RTS078PLD

No teste da Reprodutibilidade no **ELITE BeGenius**, o ensaio detetou o ADV alvo como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores da Ct que não excederam 2,6% para ADV e 3% para o Controlo Interno.

Capacidade de reprodução com material de referência certificado

A sensibilidade analítica do ensaio, como a capacidade de reprodução de um material de referência calibrado, foi avaliada utilizando como material de referência o painel calibrado Painel EQA Adenovírus de QCMD 2013 (Qnostics, Ltd, RU), um painel de diluições de Adenovírus. Cada amostra do painel foi testada em 4 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, deteção e interpretação do resultado, utilizando o **ELITE InGenius** e produtos ELITechGroup S.p.A..

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência e o ELITE InGenius		
Amostra	Estado da amostra	Positivo/réplicas
ADV13-01	Frequentemente detetado	4/4
ADV13-02	Detetado	2/4
ADV13-03	Frequentemente detetado	4/4
ADV13-04	Negativo	0/4
ADV13-05	Frequentemente detetado	4/4
ADV13-06	Detetado	4/4
ADV13-07	Frequentemente detetado	4/4
ADV13-08	Detetado	4/4
ADV13-09	Frequentemente detetado	4/4
ADV13-10	Detetado	4/4

Todas as amostras foram detetadas corretamente. A amostra ADV13-02, positiva a um título baixo, abaixo do limite de deteção teórico do ensaio, foi detetada em 2 de 4 réplicas.

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência o painel calibrado «Painel de plasma adenovírus AcroMetrix™» (Acrometrix, Life Technologies, EUA). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, deteção e interpretação do resultado, com o **ELITE InGenius** e produtos ELITechGroup S.p.A. Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o ELITE InGenius				
Amostra	Título nominal cópias/mL	Título nominal cópias/mL Registo ₁₀	Positivo/réplicas	Resultados médios Cópias/mL Registo ₁₀
Adenovírus 1E3	1000	3,000	2/2	3,030
Adenovírus 1E4	10000	4,000	2/2	3,926
Adenovírus 1E5	100000	5,000	2/2	5,052
Adenovírus 1E6	1000000	6,000	2/2	5,893
Adenovírus 1E7	10000000	7,000	2/2	6,873

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

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

REF RTS078PLD

Fator de conversão para unidades internacionais

Sangue total

O fator de conversão, para converter um resultado quantitativo de cópias/mL para Unidades internacionais/mL, foi calculado utilizando um painel de seis diluições de material de referência calibrado aprovado pela OMS ("1.ª Norma Internacional da OMS para ADN de adenovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico", NIBSC código 16/324, Reino Unido) numa matriz de sangue total testada negativa para ADN de ADV. O painel incluiu 6 passos de diluição de 0,5 Registo. Cada ponto do painel foi testado em 20 réplicas realizando toda a análise, extração, amplificação, detecção e interpretação do resultado, com o **ELITE InGenius** e produtos ELITechGroup S.p.A.

O resultado é comunicado na tabela seguinte.

Fator de conversão para unidades internacionais com o ELITE InGenius	
Matriz	Fc (IU/cópias)
Sangue Total	2,6

O fator de conversão do ADENOVIRUS ELITE MGB® Kit usado em associação com **Sangue Total** colhido em EDTA e **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** foi verificado analisando os resultados obtidos durante o estudo do intervalo de medição linear.

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

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

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

Plasma

O fator de conversão, para converter um resultado quantitativo de cópias/mL para Unidades internacionais/mL, foi calculado utilizando um painel de seis diluições de material de referência calibrado aprovado pela OMS ("1.ª Norma Internacional da OMS para ADN de adenovírus humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico", NIBSC código 16/324, Reino Unido) numa matriz de plasma testada negativa para ADN de ADV. O painel incluiu 6 passos de diluição de 0,5 Registo. Cada ponto do painel foi testado em 18 réplicas realizando toda a análise, extração, amplificação, detecção e interpretação do resultado, com o **ELITE BeGenius** e produtos ELITechGroup S.p.A.

O resultado é comunicado na tabela seguinte.

Fator de conversão para unidades internacionais com o ELITE BeGenius	
Matriz	Fc (IU/cópias)
plasma	1,9

O fator de conversão do ADENOVIRUS ELITE MGB® Kit usado em associação com **Plasma** colhido em EDTA e **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** foi verificado analisando os resultados obtidos durante o estudo do intervalo de medição linear.

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

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

Estes resultados confirmaram o fator de conversão calculados para plasma com o **ELITE BeGenius**.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

Sangue Total

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada através da análise de algumas amostras clínicas de sangue total colhidas em EDTA positivas para

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

REF RTS078PLD

ADN de PVB19 em associação com o **ELITE InGenius**. Dado que o **ELITE BeGenius** tem desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITE InGenius**, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a sensibilidade do diagnóstico do ensaio obtido em associação com o **ELITE InGenius** também se aplica ao **ELITE BeGenius**.

O teste foi realizado em 30 amostras de sangue total, colhido em EDTA, negativas para ADN de Adenovírus, que foram reforçadas para ADN de ADV com adição da amostra ADV12-01, a partir do Painel EQA Adenovírus QCMD 2012 (Qnostics Ltd, RU). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação de resultados com o **ELITE InGenius** e com produtos ELITechGroup S.p.A..

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
sangue total colhido em EDTA e positivo para ADN de ADV	30	30	0

Todas as amostras foram confirmadas positivas.

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

Plasma

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada através da análise de algumas amostras clínicas de plasma colhido em EDTA positivas para ADN de PVB19 em associação com o **ELITE BeGenius**. Dado que o **ELITE InGenius** tem desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITE BeGenius**, 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 BeGenius** também se aplica ao **ELITE InGenius**.

O teste foi realizado em 75 amostras de plasma colhidas em EDTA positivas para ADN de Adenovírus. Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação de resultados com o **ELITE BeGenius** e com produtos ELITechGroup S.p.A. Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Plasma colhido em EDTA e positivo para ADN de ADV	75	75	0

Todas as amostras foram confirmadas positivas.

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

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

Sangue Total

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

O teste foi realizado em 30 amostras de sangue total colhido em EDTA e presumivelmente negativas para ADN de Adenovírus. Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação de resultados com o **ELITE InGenius** e com produtos ELITechGroup S.p.A. Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
sangue total colhido em EDTA e negativo para ADN de ADV	30	0	30

Todas as amostras foram confirmadas negativas para ADN de ADV.

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

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

REF RTS078PLD

Plasma

A especificidade do diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi avaliada através da análise de algumas amostras clínicas de sangue total e plasma colhidas em EDTA negativas para ADN de HHV8 em associação com o **ELITE BeGenius**. Dado que o **ELITE InGenius** tem desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITE BeGenius**, 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 BeGenius** também se aplica ao **ELITE InGenius**.

O teste foi realizado em 38 amostras de plasma colhidas em EDTA que foram negativas para ADN de Adenovírus. Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação de resultados com o **ELITE BeGenius** e com produtos ELITechGroup S.p.A. Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	Negativo
Plasma colhido em EDTA e negativo para ADN de ADV	38	1	37

37 em 38 amostras foram confirmadas negativas para ADN - ADV. Uma amostra apresentou um resultado positivo discrepante a um baixo título.

A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 97,4%.

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

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser usado com **ADN extraído** das seguintes amostras clínicas: sangue total colhido em EDTA, plasma colhido em EDTA, lavagens nasais e esfregaços nasais.

Sangue total colhido em EDTA

As amostras de sangue total 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 (amostra celular) com o kit «**EXTRAblood**»,

siga o manual de instruções de funcionamento: comece com **200 µL** da amostra (máximo de 2 milhões de células), elua o ADN em **100 µL** de tampão de eluição.

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

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

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de sangue total com o instrumento «**NucliSENS®**

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

REF RTS078PLD

easyMAG®, siga o protocolo de extração **Generic 2.0.1** e siga estas instruções: transfira

100 µL de amostra para a tira de 8 furos, carregue a tira no instrumento e efetue a extração sem incubação de lise. Após o instrumento ter adicionado o Tampão lise **EasyMAG®**, sem remover a tira, misture três vezes o conteúdo da tira através da pipeta de vários canais, utilizando o número do programa 3. Faça a incubação durante 10 minutos, em seguida adicione a **Silícia magnética NucliSENS® easyMAG®** e prossiga com a extração. Elua os ácidos nucleicos em **50 µL** de tampão de eluição.

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de sangue total com o instrumento «**QIASymphony® SP/AS**» e o kit «**Kit mini de ADN QIASymphony®**» com **software versão 3.5**, utilize o protocolo de extração "**Virus Blood_200_V4_default IC**" e siga estas instruções: o instrumento é capaz de usar um tubo primário, o volume da amostra necessário para a extração é de **200 µL**, é sempre necessário um volume mínimo de

100 µL. Carregue no instrumento, na ranhura do "controle interno", os tubos que contêm o tampão ATE, como indicado no manual de instruções de utilização do kit; indique a posição onde os eluatos serão distribuídos e especifique o volume de eluição de **60 µL**. Para obter mais informações sobre o procedimento de extração, siga as indicações no manual de instruções de utilização do kit.

Plasma colhido em EDTA

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

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

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

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

Lavagens nasais

As lavagens nasais, para extração de ADN, devem ser colhidas de acordo com as diretrizes laboratoriais, diluídas numa solução fisiológica esterilizada ou PBS esterilizada, transportadas a +2°/+8 °C e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de quatro horas, caso contrário, devem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

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 zaragatoas (amostra não celular) com recurso ao kit «**EXTRAblood**», siga o manual de instruções de funcionamento: comece com **200 µL** da amostra, adicione **5 µL** de **CPE** para o controlo interno no início da extração, recupere o ADN em **60 µL** de tampão de eluição.

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de lavagens nasais 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 **Silícia magnética NucliSENS® easyMAG®**. Elua os ácidos nucleicos em **100 µL** de tampão de eluição.

Esfregaços nasais

Os esfregaços nasais, para extração de ADN, devem ser colhidos de acordo com as diretrizes laboratoriais, diluídos num meio de transporte para culturas de células ou numa solução fisiológica esterilizada ou PBS esterilizada, transportados a +2°/+8 °C e guardados a +2/+8 °C durante um período máximo de quatro horas, caso contrário, devem ser congelados e armazenados a -20 °C durante um

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

REF RTS078PLD

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 esfregaços nasais (amostra não celular) com recurso ao kit «EXTRAblood», siga o manual de instruções de funcionamento: comece com **200 µL** da amostra, adicione **5 µL** de **CPE** para o controlo interno no início da extração, recupere o ADN em **60 µL** de tampão de eluição.

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de esfregaços nasais 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 **Silícia magnética NucliSENS® easyMAG®**. Elua os ácidos nucleicos em **100 µL** de tampão de eluição.

Outras amostras

Não existem dados disponíveis relativos aos desempenhos do produto com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: sobredanante fecal, líquido cefalorraquidiano.

Substâncias interferentes

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

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

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

Controlos de amplificação

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

Para o controlo negativo, 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 «**Controlo positivo ADENOVIRUS - ELITE**» ou o produto «**ADENOVIRUS ELITE Standard**».

Controlos da qualidade

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

PROCEDIMENTO

Definição da sessão de amplificação em tempo real

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

Quando 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 ADV com o "dispositivo de relatório" = "FAM" e o "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) " e dar-lhe o nome "ADV",
- 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

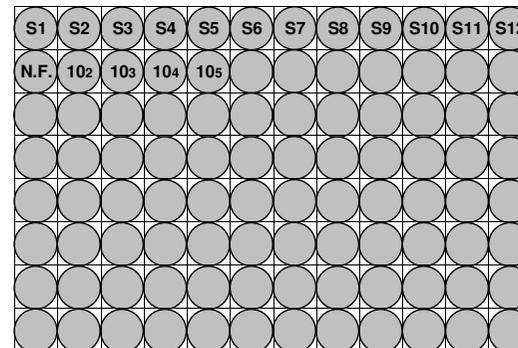
ADENOVIRUS ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS078PLD

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.



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;**

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.

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: Fast 7500",
 - definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda ADV com o "dispositivo de relatório" = "FAM" e o "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) " e dar-lhe o nome "ADV",
 - 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

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

REF RTS078PLD

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 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**.

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.

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

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

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

- Com a pipeta, introduza exatamente, colocando na mistura de reação, **20 µL** de **ADN extraído** da primeira amostra no furo correspondente da **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem a amostra introduzindo com a pipeta o **ADN extraído** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma com as outras amostras de **ADN extraído**.
- Com a pipeta, introduza exatamente, colocando na mistura de reação, **20 µL** de **água de qualidade para biologia molecular** (não fornecida com este produto) no furo da **microplaca da amplificação** do

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

REF RTS078PLD

controlo negativo da amplificação, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o controlo negativo introduzindo com a pipeta a **água de qualidade para biologia molecular** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.

- Com base no resultado necessário (qualitativo ou quantitativo), deve seguir uma das destas duas opções:

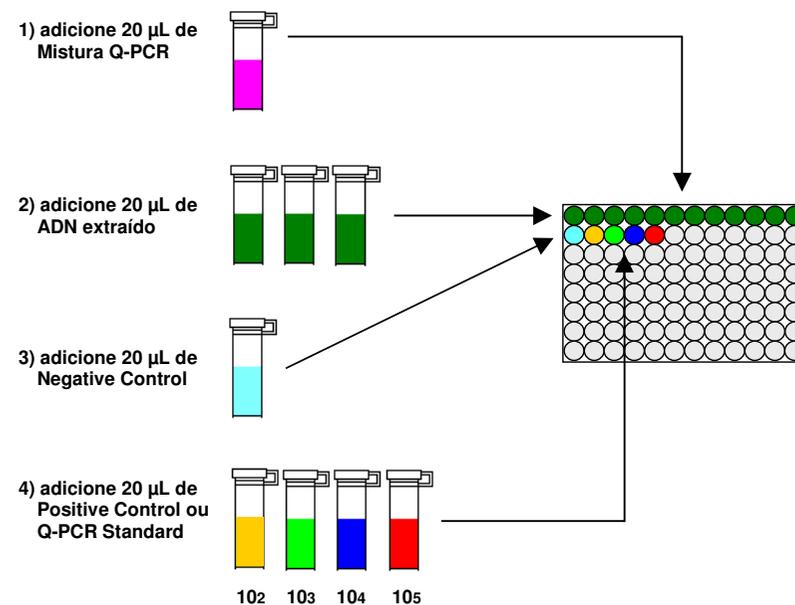
- quando for necessário um resultado **qualitativo** (deteção de ADN de ADV): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **ADV - Controlo positivo** no furo correspondente na **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**.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

- Quando for necessário um resultado **quantitativo** (quantificação de ADN de ADV): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **ADV 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 **ADV Q - PCR Standard 102** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma com os outros **ADV 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/deteção 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-ADV-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.



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

REF RTS078PLD

Nota: se a preparação da amplificação for realizada com o instrumento «**QIAasymphony® 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 ADV (detetor FAM "ADV") 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 ADV, a fluorescência FAM da sonda específica do ADV 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 "ADV" 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 "ADV" 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 **Controlo positivo***, o valor de **Ct** do ADV (Resultados > Relatório) é usado para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

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

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

* **Nota:** Quando este produto for usado para a quantificação de ADN de ADV, foram preparadas as reações de **Q - PCR Standard** em vez da reação de **Controlo positivo**. 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 **Controlo negativo**, o valor de **Ct** do ADV (Resultados > Relatório) é usado para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

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

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

REF RTS078PLD

Se o resultado da reação de amplificação **Controlo negativo** for diferente de **Ct não determinado** para ADV, 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 ADV é usado para determinar o ADN alvo, enquanto o valor de **Ct** do Controlo Interno é usado para validar a extração, amplificação e deteção.

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

Este produto é capaz de detetar uma quantidade mínima de cerca de 10 cópias de ADN do gene de proteína Hexon de ADV 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 ADV
detetor FAM "ADV"	detetor VIC "CI"			
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 ADV 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 ADV e **Ct ≤ 35** para o Controlo Interno, significa que o ADN do ADV não é detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode excluir-se o facto de o ADN do ADV 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 ADV é detetado na reação de amplificação de uma amostra, o Controlo Interno pode resultar em **Ct > 35** ou **Ct não determinado**. Na realidade, a reação de amplificação de baixa eficiência para o Controlo Interno pode ser deslocada por concorrência com a reação de amplificação de elevada eficiência para o ADN do ADV. Neste caso, a amostra é contida 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 ADV 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:

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

REF RTS078PLD

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

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

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

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

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

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

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = \frac{V_e \times \text{Quantidade}}{V_c \times V_a \times E_p}$$

Onde:

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

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

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

Quando é usado o kit de extração «**EXTRAblood**» com amostras de lavagens nasais e esfregaços nasais e é necessário o resultado **expresso em gEq/mL**, a fórmula passa a ser:

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = 15 \times \text{Quantidade}$$

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 gEq/mL**, a fórmula passa a ser:

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

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 gEq/mL**, a fórmula passa a ser:

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

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

REF RTS078PLD

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

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

Quando é usado o sistema de extração «**NucliSENS® easyMAG®**» com amostras de lavagens nasais e esfregaços nasais e é necessário o resultado **expresso em gEq/mL**, a fórmula passa a ser:

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

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

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = 23 \times \text{Quantidade}$$

Cálculo dos limites do intervalo de medição linear

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

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

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

Quando é usado o kit de extração «**EXTRAblood**» com amostras celulares, a fórmula passa a ser:

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

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

de 250 a 25.000.000 gEq/mL

Quando é usado o kit de extração «**EXTRAblood**» com amostras não celulares, a fórmula passa a ser:

$$\text{Limite inferior (gEq/mL)} = 15 \times 10 \text{ gEq}$$

$$\text{Limite superior (gEq/mL)} = 15 \times 1.000.000 \text{ gEq}$$

de 150 a 15.000.000 gEq/mL

Quando é usado o «**ELITE STAR**» com amostras celulares ou amostras não celulares, a fórmula passa a ser:

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

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

de 280 a 28.000.000 gEq/mL

Quando é usado o «**ELITE GALAXY**» com amostras celulares ou amostras não celulares, a fórmula

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

REF RTS078PLD

passa a ser:

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

Quando é usado o sistema de extração «NucliSENS® easyMAG®» com amostras celulares, a fórmula passa a ser:

Limites do intervalo de medição (gEq/mL) com «NucliSENS® easyMAG®»
Limite inferior (gEq/mL) = 50 x 10 gEq
Limite superior (gEq/mL) = 50 x 1.000.000 gEq
de 500 a 50.000.000 gEq/mL

Quando é usado o sistema de extração «NucliSENS® easyMAG®» com amostras não celulares, a fórmula passa a ser:

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

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

Limites do intervalo de medição (gEq/mL) com «QIASymphony® SP/AS»
Limite inferior (gEq/mL) = 23 x 10 gEq
Limite superior (gEq/mL) = 23 x 1.000.000 gEq
de 230 a 23.000.000 gEq/mL

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade analítica: limite de deteção

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

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

Amostras	Não.	positivo	negativo
10 cópias de ADN de plasmídeo + 500 ng de ADN genómico humano	50	50	0

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de sangue total colhido em EDTA e o ELITE GALAXY foi verificada com um painel de diluições de Adenovírus dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da amostra ADV12-01 do "Painel EQA Adenovírus QCMD 2012" (Qnostics, Ltd, RU) em ADN de Adenovírus - sangue total EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 10 gEq/mL a 560 gEq/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

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

REF RTS078PLD

regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

A sensibilidade analítica como gEq/mL está reportada a seguir

Limite de deteção para amostras de sangue total e ELITE GALAXY (gEq/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	169 gEq/mL	105 gEq/mL	430 gEq/mL

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de plasma colhido em EDTA e o ELITE GALAXY foi verificada com um painel de diluições de Adenovírus dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da amostra ADV12-01 do "Painel EQA Adenovírus QCMD 2012" (Qnostics, Ltd, RU) em ADN de Adenovírus - plasma EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 10 gEq/mL a 560 gEq/mL. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração e Configuração PCR com o ELITE GALAXY e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

A sensibilidade analítica como gEq/mL está reportada a seguir

Limite de deteção para amostras de plasma e ELITE GALAXY (gEq/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	80 gEq/mL	59 gEq/mL	196 gEq/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 de plasmídeo contendo o produto de amplificação, cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. As diluições de 107 moléculas por reação a 101 moléculas por reação foram testadas em 9 réplicas através da realização da amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

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

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

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

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

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

Os limites do intervalo de medição linear como gEq/mL referentes ao kit de extração usado são calculados na página 25.

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 de amplificação, permitiu obter uma percentagem média do Coeficiente de variação (% CV) de cerca de 28,6% 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

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

REF RTS078PLD

de uma amostra dentro da mesma sessão de amplificação e o valor de concentração teórica da amostra, permitiu obter uma percentagem média de Imprecisão (% Imprec.) de cerca de 13,1% 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, foi verificada através de testes a uma amostra de material de referência certificado.

Os testes foram realizados utilizando como material de referência certificado a amostra de Adenovírus Humano Material com marcação CE, serotipo 2, para Técnicas de amplificação de ácido nucleico (NIBSC, RU). A amostra de material de referência certificado foi testada em 2 réplicas através da realização do procedimento de extração e cada réplica foi amplificada em duplicado, por produtos ELITechGroup S.p.A..

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com material de referência certificado				
Amostra	Vírus	Ct de resultado esperado	Positivo/réplicas	Ct média
08/114-001	Adenovírus humano tipo 2	~ 30	4 / 4	29,10

A amostra foi corretamente detetada em todas as réplicas. A quantificação da amostra, expressa como valor Ct, é semelhante à declarada pelo fornecedor.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi testada com recurso a algumas amostras clínicas reforçadas com ADN de ADV.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 24 amostra de sangue total colhido em EDTA (Biological Sample Library Europe S.A.S., França) testadas negativas para ADN de ADV com um produto de amplificação agrupado CE IVD e reforçadas com material de referência certificado (Adenovirus Humano Material com marcação CE, serotipo 2, para Técnicas de amplificação de ácido nucleico, NIBSC) para obter um valor Ct de cerca de 36 (igual a cerca de 500 gEq/mL). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A..

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Não.	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA reforçado para ADN de ADV	24	24	0

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

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 30 amostras de plasma colhido em EDTA e negativas para ADN de ADV, que foram reforçadas para ADN de ADV com adição da amostra ADV12-01, a partir do Painel EQA Adenovirus QCMD 2012 (Qnostics Ltd, RU) e 30 amostras de sangue total colhido em EDTA negativas para ADN de ADV, que foram reforçadas para ADN de Adenovirus com adição da amostra ADV12-05, a partir do Painel EQA Adenovirus QCMD 2012 (Qnostics Ltd, RU). 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
Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de ADV	30	30	0
Sangue total colhido em EDTA reforçado para ADN de Adenovirus	30	29	1

29/30 amostras de sangue total foram comunicadas como positivas para ADN de ADV. Uma

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

REF RTS078PLD

amostra deu resultado negativo. Este resultado foi confirmado com uma segunda amplificação e deve-se provavelmente à possível presença de um inibidor.

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

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 30 amostras de plasma colhido em EDTA negativas para ADN de Adenovirus, que foram reforçadas para ADN de Adenovirus com adição da amostra ADV12-01, a partir do Painel EQA Adenovirus QCMD 2012 (Qnostics Ltd, RU) e 30 amostras de sangue total colhido em EDTA negativas para ADN de Adenovirus, que foram reforçadas para ADN de Adenovirus com adição da amostra ADV12-01, a partir do Painel EQA Adenovirus QCMD 2012 (Qnostics Ltd, RU). 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..

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

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

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

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

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 23 amostras de lavagens nasais reforçadas positivas para ADN de ADV com um produto de amplificação agrupado CE IVD. Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A..

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Não.	positivo	negativo
Lavagens nasais reforçadas para ADN de ADV	23	23	0

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

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

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como eficiência de deteção e quantificação com diferentes genótipos 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 do gene da proteína Hexon de ADV, incluindo os genótipos A, B, C, D, E, F e G (que corresponde a 57 serotipos), demonstrou a respetiva conservação e a ausência de mutações significativas.

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como eficiência de deteção e quantificação com diferentes genótipos, foi verificada usando algumas construções de plasmídeos que correspondem a genótipos que demonstram variações de nucleótidos na sequência da região amplificada.

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio foi verificada usando plasmídeos contendo a sequência da região amplificada dos seguintes genótipos: A serotipo 12, A serotipo 18, A serotipo 31, B serotipo 3, B serotipo 16, B serotipo 34, B serotipo 35, C serotipo 1, D serotipo 19, E serotipo 4, F serotipo 40, F serotipo 41 e G serotipo 52. A concentração inicial dos plasmídeos foi medida por um espectrofotómetro. Os plasmídeos foram diluídos a um título de 50.000, 5.000 e 500 cópias por reação. Estas amostras foram testadas em 3 réplicas a realizarem a amplificação por produtos ELITechGroup S.p.A..

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

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

REF RTS078PLD

Testes com plasmídeos que correspondem a diferentes genótipos						
	Qty esperada registro ₁₀ gEq/reac.	-	Qty esperada registro ₁₀ gEq/reac.	-	Qty esperada registro ₁₀ gEq/reac.	-
	4,699	-	3,699	-	2,699	-
Genótipo, serotipo	Qty média detetada registro ₁₀ gEq/reac.	Desvio padrão	Qty média detetada registro ₁₀ gEq/reac.	Desvio padrão	Qty média detetada registro ₁₀ gEq/reac.	Desvio padrão
A, serotipo 12	4,774	0,010	3,930	0,007	2,996	0,071
A, serotipo 18	4,626	0,016	3,670	0,006	2,641	0,070
A, serotipo 31	4,855	0,015	3,943	0,011	2,936	0,083
B, serotipo 3	4,744	0,019	3,814	0,007	2,789	0,064
B, serotipo 16	4,738	0,022	3,750	0,053	2,786	0,034
B, serotipo 34	4,635	0,020	3,661	0,035	2,589	0,019
B, serotipo 35	4,971	0,009	3,988	0,022	2,941	0,017
C, serotipo 1	4,766	0,017	3,790	0,033	2,782	0,022
D, serotipo 19	4,765	0,018	3,805	0,050	2,811	0,032
E, serotipo 4	4,995	0,011	4,059	0,008	3,079	0,024
F, serotipo 40	4,871	0,039	3,966	0,008	2,920	0,064
F, serotipo 41	4,814	0,004	3,889	0,005	2,832	0,025
G, serotipo 52	4,848	0,039	3,944	0,017	2,905	0,064

Todas as amostras foram corretamente detetadas em todas as réplicas. A quantificação obtida encontra-se dentro do intervalo definido pelo valor esperado $\pm 0,4$ registro₁₀.

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 ADV, incluindo os genomas completos CMV e EBV, 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 ADV e positivas para ADN de outros patogênicos.

A especificidade analítica foi verificada utilizando como material de referência 20 amostras de sangue total colhido em EDTA, que foram negativas para ADN de ADV mas positivas para ADN de outros patogênicos, incluindo CMV e EBV, testadas com produtos de amplificação em tempo real CE IVD. Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Não.	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA e positivo para ADN de CMV	13	0	13
Sangue total colhido em EDTA e positivo para ADN de EBV	5	0	4
Sangue total colhido em EDTA e positivo para ADN de HHV6	2	0	1

Uma amostra positiva para EBV e uma amostra positiva para HHV6 tiveram resultado inválido.

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

REF RTS078PLD

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas negativas, foi testada com recurso a algumas amostras clínicas negativas para ADN de ADV.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 24 amostras de sangue total colhido em EDTA negativas para ADN de ADV, testadas com um produto de amplificação agrupado CE IVD. Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Não.	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA negativo para ADN de ADV	24	0	24

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

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 30 amostras de plasma colhido em EDTA que foram presumivelmente negativas para ADN de ADV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD) e 30 amostras de sangue total colhido em EDTA que foram presumivelmente negativas para ADN de ADV (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
Plasma colhido em EDTA negativo para ADN de ADV	30	0	30
Sangue total colhido em EDTA presumivelmente negativo para ADN de ADV	30	0	28

Dois amostras de sangue total deram resultado inválido devido à provável presença de um inibidor. 28 amostras tiveram resultado válido para análise e foram confirmadas negativas.

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 presumivelmente negativas para ADN de Adenovírus e 34 amostras de sangue total colhido em EDTA que foram presumivelmente negativas para ADN de Adenovírus (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.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

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

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

33/34 amostras de sangue total negativas foram confirmadas negativas, 1/34 amostra teve resultado discrepante positivo (45 gEq/mL). Esta amostra a título baixo encontra-se abaixo do limite de deteção do método em teste e provavelmente também do método de referência para Adenovírus – ADN, esta amostra pode aleatoriamente testar negativa ou positiva.

A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 98,5%.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 20 amostras de lavagens nasais que estavam negativas para ADN de ADV, testadas com um produto de amplificação agrupado CE IVD. Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Legenda: C1 - C12: Amostras a serem analisadas; **NC:** Controlo de amplificação negativo;
10²: 10² cópias standard; **10³:** 10³ cópias standard; **10⁴:** 10⁴ cópias standard; **10⁵:** 10⁵ cópias standard.

Preparação da amplificação

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

Antes de iniciar a sessão, é necessário:

- recuperar e descongelar os tubos de teste que contêm as amostras a serem analisadas. Agite suavemente os tubos e depois coloque-os na centrifugadora durante 5 segundos para enviar o conteúdo para o fundo; em seguida, mantenha em gelo;
- recuperar e descongelar os tubos de teste que contêm a **Mistura ADV Q - PCR** necessária para a sessão, sem esquecer que o conteúdo de cada tubo é suficiente para realizar **25 reações**. Agite suavemente os tubos e depois coloque-os na centrifugadora durante 5 segundos para enviar o conteúdo para o fundo; em seguida, mantenha em gelo;
- recuperar e descongelar os tubos de teste que contêm o **ADV – Controlo positivo** ou, em alternativa, o **RF de controlo positivo ADV - ELITE** ou **ADV Q - PCR Standard**. Agite suavemente os tubos e depois coloque-os na centrifugadora durante 5 segundos para enviar o conteúdo para o fundo; em seguida, mantenha em gelo;
- recuperar a **Placa AD** a ser utilizada na sessão, certificando-se de que usa luvas sem poeiras para a manusear e que não danifica os furos.

1. Sem criar quaisquer bolhas e depositando exatamente no fundo, transfira **20 µL** da mistura de reação **Mistura ADV Q - PCR** para os furos na **Placa AD** como previamente estabelecido no **Plano de trabalho**.

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

2. Depositando precisamente na mistura de reação, transfira **20 µL** do **ADN extraído** da primeira amostra para o furo correspondente na **Placa AD** como previamente estabelecido no **Plano de trabalho**. Misture bem a amostra introduzindo com a pipeta o **ADN extraído** três vezes na mistura de reação. Certifique-se de que não cria quaisquer bolhas. Proceda da mesma forma com todo o restante **ADN extraído**.

3. Depositando precisamente na mistura de reação, transfira **20 µL** de **água de qualidade para biologia molecular ultra pura** (não fornecida com o produto) para o furo na **Placa AD** que contém o controlo de amplificação negativo, como previamente estabelecido no **Plano de trabalho**. Misture bem o controlo negativo introduzindo com a pipeta a **água de qualidade para biologia molecular ultra pura** três vezes na mistura de reação. Certifique-se de que não cria quaisquer bolhas.

4. Com base no resultado necessário (qualitativo ou quantitativo), deve seguir uma das destas duas opções:

- quando for necessário um resultado **qualitativo** (deteção de ADN de Adenovírus): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **ADV - Controlo positivo** ou, em alternativa, **RF de controlo positivo ADV - ELITE** no furo correspondente da **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Plano de trabalho**. Misture bem o controlo positivo introduzindo com a pipeta o **ADV - Controlo positivo** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.

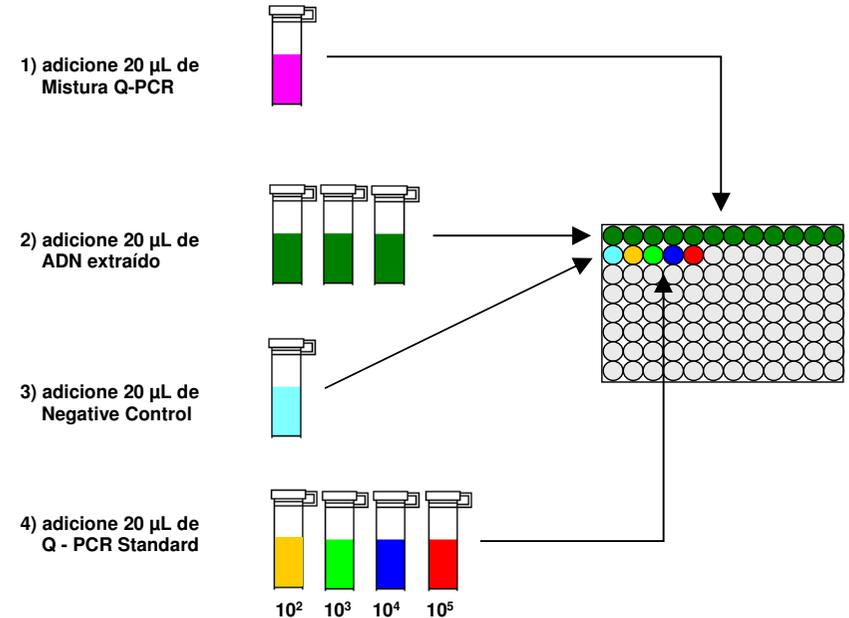
- quando for necessário um resultado **quantitativo** (quantificação de ADN de Adenovírus): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **ADV Q - PCR Standard 102** no furo correspondente na **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Plano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

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

6. Transfira a **Placa AD** para o ciclo térmico em tempo real na área de amplificação/deteção de produtos de amplificação e inicie o ciclo térmico da amplificação, guardando as definições da sessão com um identificador único e reconhecível (por ex., "ano-mês-dia-ADV-EGSpA").

Nota: No final do ciclo térmico, a **Placa AD** e os produtos de reação devem ser removidos do instrumento e eliminados de uma forma que não cause poluição ambiental. **Nunca retire a Película vedante da microplaca da amplificação**, para evitar qualquer fuga dos produtos de reação.

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



Análise dos resultados qualitativos

Os valores de fluorescência emitidos pelo detetor de ADV e o detetor do Controlo Interno (CI) durante as reações de amplificação devem ser analisados pelo software do instrumento.

Selecione o menu "Análise" e escolha "Pontos absolutos de quant/ajuste" (2 pontos)

Selecione o grupo de amostras a serem analisadas

De acordo com a documentação do instrumento, antes de iniciar a análise deve:

- introduzir manualmente o intervalo de cálculo (Botão de fundo) para o **Nível de fluorescência de fundo** desde o ciclo 2 até ao ciclo 6.

- defina manualmente o **Limiar** e **Banda de ruído** para o detetor FAM "ADV" para **0,80**;

- defina manualmente o **Limiar** e **Banda de ruído** para o detetor VCI "CI" para **1,5**;

Os valores de fluorescência emitidos pelos detetores específicos na reação de amplificação e os valores de fluorescência do **Limiar** e **Banda de ruído** são usados para determinar o **Ciclo do limiar (Ct)**, ou seja, o ciclo em que é alcançado o **Limiar** de fluorescência.

Os valores **Ct** para ADV nas reações de amplificação dos quatro **Q - PCR Standard** são usados para calcular a **Curva Standard** (Resultados > Curva Standard) dessa sessão de amplificação e para validar a amplificação e a deteção como mostrado na tabela seguinte:

Reação Q - PCR Standard 10 ⁵ Detetor "ADV"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETO

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

REF RTS078PLD

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

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

Durante a reação de amplificação **Controlo negativo**, o valor de **Ct** do ADV (Janela de análise) é usado para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Reação de controlo negativo Detetor "ADV"	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 ADV, foi detetada a presença do ADN alvo. Ocorreram problemas durante a fase de amplificação (contaminação) que podem causar resultados incorretos e falsos positivos. A sessão é inválida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Durante as reações de amplificação para cada **amostra**, o valor de **Ct** do ADV é usado para determinar a presença do ADN alvo, enquanto o valor de **Ct** para o Controlo Interno é usado para validar a extração, amplificação e deteção.

Nota: Verifique com o software do instrumento (Janela de análise) que o **Ct** foi determinado por um aumento rápido e regular dos valores de fluorescência e não por picos ou um aumento do sinal de fundo (fundo irregular ou ruidoso).

Os resultados como o **Ct** das reações de amplificação de cada **amostra** (Janela de análise) são usados como mostrado na tabela seguinte:

Reação da amostra		Adequação da amostra	Resultado do ensaio	ADN de ADV
Detetor "ADV"	Detetor "IC"			
Ct não determinado	Ct > 35 ou Ct não determinado	não adequado	inválido	-
	Ct ≤ 35	adequado	válido, negativo	NÃO DETETADO
Ct determinado	Ct > 35 ou Ct não determinado	adequado	válido, positivo	DETETADO
	Ct ≤ 35	adequado	válido, positivo	DETETADO

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct não determinado** para ADV e **Ct > 35** ou **Ct não determinado** para o Controlo Interno, não foi possível detetar eficientemente o ADN do Controlo Interno. Neste caso, ocorreram problemas durante a fase de amplificação (amplificação ineficiente ou nula) ou na fase de extração (ADN da amostra degradado, amostra com números insuficientes de células, perda de ADN durante a extração ou presença de inibidores no ADN extraído) que podem causar resultados incorretos e falsos negativos. A amostra não é adequada, o ensaio não é válido e deve ser repetido, começando pela extração de uma nova amostra.

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct não determinado** para ADV e **Ct ≤ 35** para o Controlo Interno, o ADN do ADV não foi detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode excluir-se o facto de o ADN do ADV estar presente a uma concentração inferior ao limite de deteção do produto (ver Características de desempenho). Neste caso, o resultado constituiria um falso negativo.

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

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

REF RTS078PLD

Nota: Quando for detetado o ADN do ADV durante a reação de amplificação de uma amostra, a amplificação do Controlo Interno pode produzir um resultado de **Ct > 35** ou **Ct não determinado**. Na realidade, a reação de amplificação do Controlo Interno de baixa eficiência pode ser eliminada da competição com a reação de ADV de elevada eficiência. Neste caso, a amostra é adequada e o resultado positivo do ensaio é válido.

Análise dos resultados quantitativos

Após ter realizado o procedimento de análise qualitativa, pode efetuar a análise quantitativa dos resultados relacionados com a amostra positiva.

Se o resultado da reação de amplificação para o **Q - PCR Standard 10⁵** for **Ct > 25** ou **Ct não determinado** ou se os valores de **Ct** dos quatro **Q - PCR standards** não se ajustarem regularmente à curva standard, o ADN alvo não foi corretamente detetado. Ocorreram problemas durante a fase de amplificação ou deteção (distribuição incorreta da mistura de reação ou dos standards, degradação da mistura de reação ou dos standards, definição incorreta da posição dos standards, definição incorreta do ciclo térmico) que podem causar resultados incorretos. A sessão é inválida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Os valores de **Ct** para o ADV nas reações de amplificação de cada **amostra** e a **Curva standard** (botão **Curva standard**) da sessão de amplificação são usados para calcular a **Quantidade** de ADN alvo presente nas reações de amplificação relacionadas com as amostras.

Este produto é capaz de quantificar desde 1.000.000 até cerca de 10 cópias por reação, desde 25.000.000 a 250 cópias por mL de sangue total utilizando o sistema de extração **MagNA Pure 24** (ver Características de desempenho), como mostrados na tabela seguinte:

Resultado da amostra Detetor FAM "ADV"	Cópias ADV por reação
Quantidade > 1 x 10⁶	MAIS DE 1.000.000
1,0 x 10¹ ≤ Quantidade ≤ 1 x 10⁶	= Quantidade
Quantidade < 1,0 x 10¹	MENOS DE 10

Os resultados (**Quantidade**) relacionados com cada **amostra** (Janela de análise) são usados para calcular as **cópias** de ADV presentes na amostra de origem (**Nc**) de acordo com esta fórmula:

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

Onde:

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

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

Ve é o volume total obtido da extração **expresso em µL**;

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

Quantidade é o resultado da reação de amplificação relacionado com a amostra **expressa em cópias por reação**.

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

Fórmula simplificada para sangue total e MagNA Pure 24
Nc (cópias/mL) = 25 x Quantidade

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade analítica: limite de detecção

A sensibilidade analítica deste ensaio, como limite de detecção, permite a detecção de cerca de 10 cópias em 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A sensibilidade analítica deste ensaio, como limite de detecção, foi testado usando um ADN de plasmídeo que contém o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida usando um espectrofotômetro. O ADN de plasmídeo foi diluído para uma concentração de 10 cópias/20 µL em 150.000 cópias de pBETAGLOBIN/20 µL. Esta amostra foi utilizada em 36 réplicas para realizar a amplificação utilizando produtos ELITechGroup S.p.A.. Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivos	negativos
10 cópias de ADN de plasmídeo + 150.000 cópias de Beta-globina	36	36	0

Sensibilidade analítica: intervalo de medição linear

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

A sensibilidade analítica deste ensaio foi avaliada com recurso a um painel de diluições (1 registo₁₀ entre uma diluição e a seguinte) de ADN de plasmídeo contendo o produto de amplificação, cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotômetro. Os pontos do painel de 10⁷ moléculas por reação a 10¹ moléculas por reação foram testadas em 9 réplicas para realização da amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise dos dados obtidos, realizada com regressão linear, mostrou que o ensaio tem uma resposta linear para todos os pontos do painel (coeficiente de correlação linear superior a 0,99).

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

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

Os resultados estão mostrados na tabela seguinte.

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

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

Sensibilidade analítica: Precisão e exatidão

A precisão deste ensaio, em termos de variabilidade dos resultados obtidos na mesma sessão de amplificação utilizando diferentes réplicas de uma amostra, permitiu obter uma percentagem média do Coeficiente de variação (% VC) dos valores de Ct inferior a 2%, dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas em 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A precisão deste ensaio, em termos de variabilidade dos resultados obtidos na mesma sessão de amplificação utilizando diferentes réplicas de uma amostra, permitiu obter uma percentagem média do Coeficiente de variação (% VC) das quantidades medidas de cerca de 9% dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas em 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A precisão deste ensaio, em termos de diferença entre a média dos resultados obtidos na mesma sessão de amplificação utilizando diferentes réplicas de uma amostra e o valor de concentração teórica da amostra, permitiu obter uma percentagem média de Imprecisão da quantidade de Registo medida de cerca de 1% dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas em 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A precisão e a exatidão foram determinadas utilizando os dados obtidos durante as experiências que avaliam o intervalo de medição linear.

Sensibilidade analítica: capacidade de reprodução com material de referência certificado

A sensibilidade analítica do ensaio, como a capacidade de reprodução do valor de um material de referência calibrado, foi avaliada utilizando como material de referência o «Painel “Q” molecular de ADENOVIRUS (Qnostics Ltd, RU). Cada amostra do painel foi testada em 4 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática MAGNA Pure 24 e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o «MagNA Pure 24»	
Amostra	Positivos/réplicas
ADVMQP01-Alto	4/4
ADVMQP01-Médio	4/4
ADVMQP01-Baixo	4/4
ADVMQP01-Negativo	0/4

Todas as amostras foram detetadas corretamente.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 29 amostras de sangue total colhido em EDTA negativas para amostras de ADN de ADV que foram reforçadas para ADN de ADV com adição da amostra ADVMQP01-Alto (Qnostics Ltd, RU).

Cada amostra foi usada para realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática **MagNA Pure 24** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivos	negativos
Sangue total colhido em EDTA reforçado para ADN de Adenovírus	29	29	0

Todas as amostras de sangue total foram válidas no primeiro teste e confirmadas positivas para ADN de ADV.

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

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 41 amostras de sangue total colhido em EDTA presumivelmente negativas para ADN de ADV.

Cada amostra foi usada para realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática **MagNA Pure 24** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivos	negativos
Sangue total colhido em EDTA presumivelmente negativo para ADN de ADV	41	0	41

Todas as amostras de sangue total foram válidas no primeiro teste e confirmadas negativas para ADN de ADV.

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

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

REF RTS078PLD

Robustez: resultados inválidos utilizando amostras clínicas

A robustez deste ensaio, em termos da avaliação de resultados inválidos utilizando amostras clínicas na primeira análise, foi verificada através da análise de amostras clínicas.

O número de amostras inválidas foi verificado utilizando os resultados de amostras clínicas que foram negativas e positivas para ADN de Adenovírus e analisadas com o sistema de extração automática **MagNA Pure 24** e através da amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.. Os resultados estão mostrados na tabela seguinte.

Amostras	N	Inválido	%
Sangue total colhido em EDTA	71	1	1,5

Nota: Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e os instrumentos estão registados na Secção 7 do Ficheiro técnico do produto "Adenovírus ELITE MGB® Kit", FTP RTS078PLD.

REFERÊNCIAS

Saitoh - Inagawa W. et al. (1996) J. Clin. Microbiol. 34: 2113 - 2116
Wong S. et al. (2008) J. Med. Virol. 80: 856 - 865
E. A. Lukhtanov et al. (2007) Nucleic Acids Res. 35: e30

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Utilize este produto apenas com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: sangue total colhido em EDTA, plasma colhido em EDTA, lavagens nasais e esfregaços nasais.

Não use o ADN extraído de amostras que contém 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 existem dados disponíveis relativos aos desempenhos do produto com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: sobredanante fecal, líquido cefalorraquidiano.

Este produto apenas com instrumentos validados e amostras clínicas associadas indicados na secção "Amostras e controlos".

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

Os resultados obtidos com este produto dependem de uma identificação, uma recolha, um armazenamento de transporte e um processamento adequados das amostras. Para evitar resultados incorretos, é por isso necessário ter cuidado durante estes passos e seguir cuidadosamente as instruções de utilização fornecidas com os produtos para extração de ácido nucleico.

Devido à sua elevada sensibilidade analítica, o método de amplificação em Tempo real usado neste produto é sensível a contaminações cruzadas a partir de amostras clínicas positivas do ADV, dos controlos positivos e dos mesmos produtos de amplificação. Contaminações cruzadas causadas por falsos resultados positivos. O formato do produto é capaz de limitar as contaminações cruzadas; no entanto, estas apenas podem ser evitadas com boas práticas laboratoriais e seguindo cuidadosamente este manual de instruções de utilização.

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

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

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

Este produto deve ser manuseado por pessoal qualificado e com formação em técnicas de biologia

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

REF RTS078PLD

molecular, como extração, amplificação e deteção de ácidos nucleicos, para evitar resultados incorretos.

É necessário ter áreas separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação para evitar falsos resultados positivos.

Este produto requer o uso de vestuário e instrumentos especiais para extração/preparação de reações de amplificação e para amplificação/deteção de produtos de amplificação, para evitar falsos resultados positivos.

Devido a diferenças inerentes entre tecnologias, é recomendado que os utilizadores realizem estudos de correlação do método para calcular diferenças tecnológicas antes de mudar para uma nova tecnologia.

Um resultado negativo obtido com este produto significa que o ADN de ADV não foi detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode negligenciar-se o facto de o ADN de ADV ter um título mais baixo que o limite de deteção do produto (Ver Características de desempenho). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

Os resultados obtidos com este produto podem, por vezes, ser inválidos devido a uma falha do controlo interno e exigir um novo teste, começando pela extração; o que pode causar um atraso na obtenção dos resultados finais.

Possíveis polimorfismos na região do genoma viral abrangido pelos primários do produto e as sondas podem prejudicar a deteção e quantificação do ADN de ADV.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, os resultados obtidos com este produto devem ser interpretados tendo em conta todos os dados clínicos e outros testes laboratoriais efetuados ao doente.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, existe um risco residual de resultados inválidos, falsos positivos e falsos negativos obtidos com este produto. Este risco residual não pode ser eliminado ou ainda mais reduzido. Em alguns casos, como o diagnóstico pré-natal, este risco residual pode contribuir para decisões erradas com potenciais efeitos perigosos para o doente.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

ADN alvo não detetado nas reações de Positive Control ou Q - PCR Standard ou coeficiente de correlação inválido da Curva standard	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	Tenha cuidado quando distribuir reações para os furos da microplaca e cumpra a ficha de trabalho. Verifique os volumes da mistura de reação distribuída. Verifique os volumes do controlo positivo ou standard distribuído.
Preparação da sessão incorreta no ELITE InGenius e no ELITE BeGenius.	Verifique a posição da mistura de reação, do controlo positivo ou dos standards. Verifique os volumes da mistura de reação, do controlo positivo ou dos standards.
Degradação da sonda.	Use uma nova alíquota da mistura de reação.
Degradação do controlo positivo ou standard.	Utilize uma nova alíquota de controlo positivo ou standard.
Erro na configuração do instrumento.	Verifique as definições de posição para as reações 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.
Preparação da sessão incorreta no ELITE InGenius e no ELITE BeGenius.	Verifique a posição da mistura de reação, do controlo positivo ou dos standards. Verifique os volumes da mistura de reação, do controlo positivo ou dos standards.
Erro durante a definição do instrumento	Verifique as definições de posição das amostras, dos controlos negativos, dos controlos positivos ou dos standards no instrumento
Microplaca mal vedada.	Tenha cuidado quando vedar a microplaca.
Contaminação da água de qualidade para biologia molecular.	Utilize uma nova alíquota de água.
Contaminação da mistura de reação.	Use uma nova alíquota da mistura de reação.
Contaminação da área de extração/preparação para reações de amplificação.	Limpe as superfícies e instrumentos com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos de ensaio e as pontas em utilização.

ADN alvo e de Internal Control não detetado nas reações da amostra	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	Evite derramar o conteúdo do tubo de teste da amostra. Mude sempre as pontas entre uma amostra e a outra. Tenha cuidado quando distribuir amostras para os furos da microplaca e cumpra a ficha de trabalho.
Preparação da sessão incorreta no ELITE InGenius e no ELITE BeGenius	Verifique a posição da mistura de reação ou das amostras. Verifique os volumes da mistura de reação ou das amostras.
Degradação do Controlo Interno.	Utilize novas alíquotas de Controlo Interno.
Inibição devido a substâncias que interferem na amostra.	Repita a amplificação com uma diluição 1:2 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR only". Repita a extração e amplificação da amostra.
Armazenamento incorreto do reagente.	Verifique se a mistura de reação não foi exposta a uma temperatura ambiente durante mais de 30 minutos.
Problemas durante a extração	Verifique a qualidade e a concentração do ADN extraído.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Fluorescência de fundo irregular ou elevada nas reações	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta da amostra.	Tenha cuidado, inserindo a pipeta três vezes, quando misturar amostras, controlos negativos, 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".
Com ELITE InGenius: Erro 30103	
Causas possíveis	Soluções
Concentração demasiado alta do alvo na amostra.	Se for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR: - repita a amplificação da amostra eluída em água de qualidade para biologia molecular, numa sessão "Apenas PCR" ou - repita a extração com uma diluição da amostra primária em água de qualidade para biologia molecular, numa sessão "Extração+PCR".

SÍMBOLOS

- REF** Número do catálogo.
-  Limite máximo da temperatura.
- LOT** Código do lote.
-  Usar até (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 para diagnóstico *in vitro*.
-  Contém suficiente para "N" testes.
-  Atenção, consulte as instruções de utilização.
- CONT** Conteúdo.
-  Manter afastado da luz solar.
-  Fabricante.

**NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA
LIMITADA**

Este produto contém reagentes com licença do LTC.

Este produto é vendido ao abrigo de acordos de licenciamento celebrados entre o ELITechGroup S.p.A. e as respetivas sucursais e o LTC. 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, LTC Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Telefone: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. E-mail: outlicensing@LTC.com.

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

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

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

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

«ELITe MGB®» e o logótipo «ELITe MGB®» são marcas comerciais registadas na União Europeia.

ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® são marcas comerciais registadas do ELITechGroup

MagNA Pure é uma marca comercial da Roche.

ADENOVIRUS ELITE MGB® kit used with Genius series Platforms

Ref.: RTS078PLD



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The «**ADENOVIRUS ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of human Adenovirus (ADV)**, genotypes A, B, C, D, E, F and G (including 57 serotypes).

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of Adenovirus infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

The assay is CE-IVD validated in combination with **Whole Blood EDTA** and **Plasma EDTA** and the instrument **ELITE InGenius®** and **ELITE BeGenius®**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
ADV	Hexon protein gene	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525 (VIC)

C. Validated matrix

› **Whole Blood EDTA**

› **Plasma EDTA**

D. Kit component

ADV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 96
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> › ELITE InGenius instrument: INT030 › ELITE BeGenius instrument: INT040 › ELITE InGenius SP200 extraction cartridge: INT032SP200 › ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR › ELITE InGenius SP200 Consumable Set › CPE – Internal Control: CTRCPE | <ul style="list-style-type: none"> › ADENOVIRUS ELITE Standard : STD078PLD › ADENOVISURS - ELITE Positive Control: CTR078PLD › ELITE InGenius Waste Box: F2102-000 › Filter Tips 300: TF-350-L-R-S (for INT030) › 1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118 (for INT040) |
|---|---|

F. ELITE InGenius protocol

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

G. ELITE InGenius/ ELITE BeGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	117 IU/mL – 45 cp/mL	100% 30/30*	100% 30/30*
Plasma	89 IU/mL – 47 cp/mL	100% 75/75*	97.4% 37/38*

*confirmed samples/ tested samples

Matrix	Linearity (cp/mL)	Linearity (IU/mL)	Conversion Factor
Whole Blood	45 – 25,000,000	117 – 65,000,000	2.6 IU/copies
Plasma	47 – 34,210,527	89 – 65,000,001	1.9 IU/copies

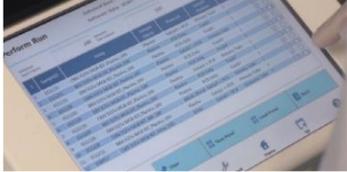
I. ELITE InGenius Procedures

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

Before analysis

1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"	2. Verify calibrators: ADV Q-PCR Standard in the "Calibration menu" Verify controls: ADV positive and negative. controls in the "Control menu" <i>N.B:</i> Both have been run, approved and not expired	3. Thaw the ADV Q- PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec
---	---	---

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen 	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", eluate: "100 µL" 	3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID 
4. Select the "Assay protocol" of interest 	5. Select the sample position: Primary tube or extraction tube 	6. Load the ADV Q-PCR Mix and the CPE Internal Control in the inventory block 
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, extraction tube and primary sample racks 	8. Close the door Start the run 	9. View, approve and store the results 

Procedure 2 - PCR only

1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Extra tube"	6. Load the extracted nucleic acid tubes in the rack n°4
7. Load the PCR cassette rack Load the Q-PCR Mix in the inventory block	8. Close the door Start the run	9. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position: Primary tube or Secondary tube	6. Load the Internal Control in the inventory block
--	--	---

7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, extraction tube and primary sample racks

8. Close the door
Start the run

9. Archive the eluate sample

ELiTe BeGenius Procedures

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

Before analysis

1. Switch on ELiTe BeGenius Identification with username and password
Select the mode "Closed"

2. Verify calibrators: ADV Q-PCR standard in the "Calibration menu"
Verify controls: ADV pos. and neg. controls in the "Control menu"
NB: Both have been run, approved and not expired

3. Thaw the ADV Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes
Vortex gently
Spin down 5 sec

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

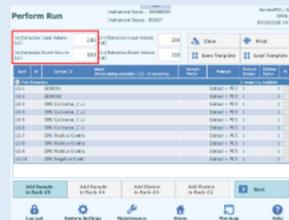
1. Select "Perform Run" on the touch screen



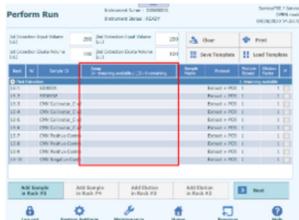
2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active



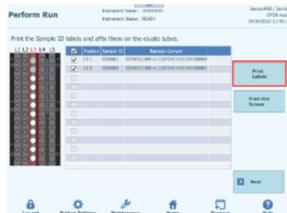
3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"



4. Select the "Assay protocol" of interest



5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area



6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in Reagent Rack and insert it in the cooling area



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

7. Load: Filter Tips, Extraction rack, and PCR rack



8. Close the door
Start the run



9. View, approve and store the results



Procedure 2 - PCR only

1. Select "Perform Run" on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»

2. Load the extracted nucleic acid barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area"

3. Select the "Assay protocol" of interest

4. Load the Q-PCR-Mix in Reagent Rack and insert it in the cooling area
Load filter tips and the PCR rack

5. Close the door.
Start the run

6. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the protocol "Extraction Only" in the Assay Protocol selection screen.	6. Load the CPE Internal Control in the Elution Rack and insert it in the cooling area
7. Load: Filter Tips and the Extraction Rack	8. Close the door Start the run	9. Archive the eluate sample



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The «ADENOVIRUS ELITE MGB® Kit» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of human Adenovirus (ADV)**, genotypes A, B, C, D, E, F and G (including 57 serotypes), in DNA samples extracted from whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA, nasal washes and nasal swabs.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of Adenovirus infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with **ABI PCR thermal-cyclers** (Thermo-Fisher) and the following extraction systems: **ELITE STAR** (ELITechGroup), **ELITE GALAXY** (ELITechGroup), **easyMAG** (BioMérieux) or **QIASymphony** (Qiagen).

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
ADV	Hexon protein gene	FAM
Internal Control	human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

- › Whole blood EDTA
- › Plasma EDTA
- › Nasal washes
- › Nasal swabs

D. Kit content

ADV Q-PCR Mix



X 4

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

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

E. Material required not provided in the kit

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> › 7500 Fast Dx and 7300 PCR Instrument › ELITE STAR: INT010 › ELITE STAR 200 extraction kit: INT011EX › ELITE GALAXY: INT020 › ELITE GALAXY 300 extraction kit: INT021EX | <ul style="list-style-type: none"> › ADENOVIRUS ELITE Standard: STD078PLD › ADENOVIRUS ELITE Positive control: CTR078PLD › CPE Internal Control: CTCRPE › easyMAG - Generic protocol 2.0.1 › QIASymphony - DNA Mini kit or DSP Virus/Pathogen Midi kit › Molecular biology grade water |
|--|--|

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ELITE STAR - ABI	Whole blood	10 gEq/reaction	97% (29/30)*	100% (28/28)*
	Plasma	10 gEq/reaction	100% (30/30)*	100% (30/30)*
ELITE GALAXY - ABI	Whole blood	169 gEq/mL	100% (30/30)*	97% (33/34)*
	Plasma	80 gEq/mL	100% (30/30)*	100% (34/34)*

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

The procedure below summarized the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELITe Star	WB, Plasma	200 µL	700 µL	100 µL	200 µL
ELITe Galaxy	WB, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	WB	100 µL	-	50 µL	-
	Nasal washes/swabs	500 µL	-	100 µL	5 µL
QIASymphony	WB	200 µL	100 µL	60 µL	-

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

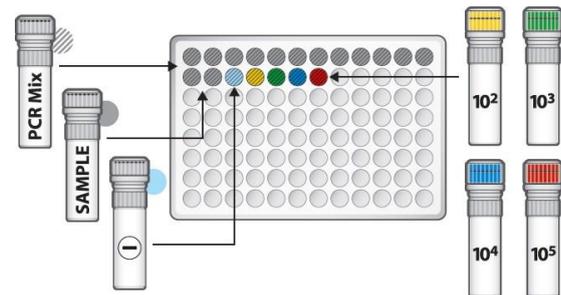
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "ADV" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C

Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
	72°C	20 sec

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

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw ADV Q-PCR Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet 20 µL of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add, 20 µL of extracted DNA in sample wells, 20 µL of molecular grade water in Negative Control well, and 20 µL of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification - Baseline and Threshold for qualitative analysis

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

Interpretation - Qualitative results

ADV Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	–	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The ADV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction.

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ cp/reaction or approximately from 100 to 10⁷ cp/mL.

ADENOVIRUS ELITE MGB® Kit used with COBAS PCR instrument

Ref.: RTS078PLD



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The «ADENOVIRUS ELITE MGB® Kit» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of human Adenovirus (ADV)**, genotypes A, B, C, D, E, F and G (including 57 serotypes), in DNA samples extracted from whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA, nasal washes and nasal swabs.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of Adenovirus infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with **Cobas – Z 480 analyzer** (Roche) and the following extraction systems: **MagNA Pure 24 System**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
ADV	Hexon protein gene	FAM
Internal Control	human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

- › Whole blood EDTA

D. Kit content

ADV Q-PCR Mix



X 4

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

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

E. Material required not provided in the kit

- › Cobas – Z 480 analyzer PCR Instrument
- › MagNA Pure 24 System, software 1.0
- › ADENOVIRUS - ELITE Positive Control: CTR078PLD
- › ADENOVIRUS ELITE Standard: STD078PLD
- › CPE Internal Control: CTCRCPE
- › Molecular biology grade water

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole blood	10 cp/reaction	100% (29/29)*	100% (41/41)*

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

The procedure below summarized the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
MagNA Pure 24	WB	350 µL	-	100 µL	20 µL

Amplification – Settings of Cobas-z 480 instruments

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

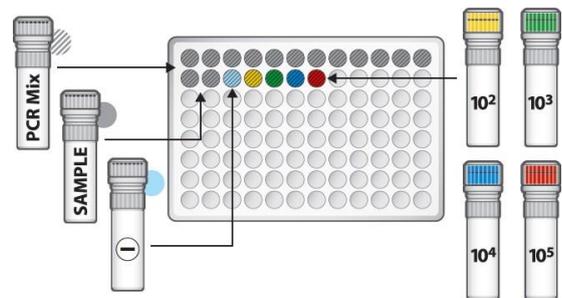
Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min

Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
45 cycles	72°C	20 sec

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

Amplification – PCR Set-up

1. Thaw ADV Q-PCR Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet 20 µL of Q-PCR Mix in all microplate wells in use
4. Add, 20 µL of extracted DNA in sample wells, 20 µL of molecular grade water in Negative Control well, and 20 µL of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification – Background and Threshold for qualitative analysis

Instrument	Matrix	Background	ADV FAM	Internal Control VIC
Cobas-Z 480 PCR instruments	WB	2 - 6	0.8	1.5

Interpretation - Qualitative results

ADV Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	–	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

*Repeat the assay starting from the extraction

Interpretation - Quantitative results

The ADV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction.

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ cp/reaction or approximately from 100 to 10⁷ cp/mL.

