Instructions for use

BKV ELITe MGB® Kit

reagentes para PCR em tempo real do ADN

REF RTS175PLD

UDI 08033891483654

CE 0123

IVD

HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES

Rev.	Aviso de alteração	Dados (dd/mm/ /aaaa)
22–R	Expansão de utilização do produto em associação com o instrumento MyGenius PRO (ref. INT050) com matriz de plasma. Expansão da utilização do produto em associação com os instrumentos ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® e matriz de sangue total colhido em EDTA (EDTA-WB). Atualização dos anexos: detalhes sobre o procedimento congelação/descongelação.	05/10/ /2026
21–R	Correção de erros de digitação: Repetibilidade inter-sessões no ELITe BeGenius (tabela 20) e Limite de deteção para amostras de plasma e ELITe GALAXY (tabela 38).	15/05/ /2026
20–R	Expansão de utilização do produto em associação com o instrumento MyGenius PRO (ref. INT050) com matriz de urina. Atualização do parágrafo “Nota para o adquirente: Licença limitada”. Atualização para o “Modelo 2 versão 4.0.2” dos protocolos de ensaio para os instrumentos ELITe InGenius® (REF INT030) e ELITe BeGenius® (REF INT040).	26/02/ /2026
19–R	Atualização para conformidade com o Regulamento (UE) 2017/746 em matéria de requisitos de dispositivo médico para diagnóstico in vitro (IVDR). Upgrade dos desempenhos analíticos e de diagnóstico no parágrafo CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO Atualização da utilização prevista: • Validação dos produtos em associação com os instrumentos ELITe InGenius (REF INT030) e ELITe BeGenius (REF INT040) com matrizes de plasma colhido em EDTA e urina colhida sem conservantes. • Validação dos produtos em associação com a matriz de plasma colhido em EDTA e os seguintes instrumentos: ELITe GALAXY e instrumento ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR. **NOTE** A composição do produto permanece inalterada Novos gráficos e definição de conteúdos das instruções de utilização.	26/09/ /2024
18	Utilização extensiva do produto em associação com o instrumento «ELITe BeGenius®» Atualização das CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO: • Alteração no limite de deteção (LdD) • Alteração no intervalo de medição linear • Adição da repetibilidade • Adição da reprodutibilidade	22/10/ /2021
17	Adição da referência ao novo produto “BKV – ELITe Positive Control RF” (ref. CTR175PLD-R). Alargamento da utilização do produto em associação com a plataforma Roche cobas z 480 analyzer.	25/01/ /2021
16	Correção do valor CV% relatado na tabela “Precisão com amostras de plasma e o ELITe InGenius (volume da amostra de 1000 µL)”	01/08/ /2019
15	Modificação dos valores de LdD e LdQ para plasma e urina em associação com o instrumento ELITe InGenius®.	11/06/ /2019
14	Extensão de utilização com o kit de extração ELITe InGenius® SP 1000	05/07/ /2018
13	Atualização da secção Características de desempenho (ULoQ).	27/04/ /2018

12	Atualização da secção Características de desempenho (LdD e linearidade)	22/12/ /2017
00 — 11	Desenvolvimento de novo produto e alterações subsequentes	-

ÍNDICE

1 UTILIZAÇÃO PREVISTA 5
2 PRINCÍPIOS DO ENSAIO 5
3 DESCRIÇÃO DO PRODUTO 5
4 MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO 6
5 MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO 6
6 OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS 6
7 AVISOS E PRECAUÇÕES 8
8 AMOSTRAS E CONTROLOS para o ELITe InGenius, ELITe BeGenius E MyGenius PRO 9
9 PROCEDIMENTO do ELITe InGenius 14
10 PROCEDIMENTO do ELITe BeGenius 21
11 PROCEDIMENTO MyGenius PRO 27
12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO 32
13 AMOSTRAS E CONTROLOS PARA O Instrumento ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR 44
14 PROCEDIMENTO do instrumento ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR 44
15 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O Instrumento ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR 51
16 REFERÊNCIAS 54
17 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO 55
18 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS 57
19 SÍMBOLOS 65
20 NOTIFICAÇÃO PARA OS UTILIZADORES 66
21 NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA 66
Appendix A QUICK START GUIDE 67
Appendix B QUICK START GUIDE 72
Appendix C QUICK START GUIDE 75

1 UTILIZAÇÃO PREVISTA

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

O ensaio é validado em associação com os instrumentos **ELITe InGenius®** e **ELITe BeGenius®** automatizados e integrados para extração, PCR em tempo real e interpretação de resultados, utilizando amostras humanas de plasma colhido em EDTA, urina colhida sem conservantes e sangue total colhido em EDTA.

O ensaio foi também validado em associação com o instrumento **MyGenius PRO®** (nome de registo ELIVERSE®), sistemas automatizados e integrados para a extração, a PCR em tempo real e a interpretação dos resultados, usando amostras humanas de plasma colhido em EDTA e urina colhida em conservantes.

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

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

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

2 PRINCÍPIOS DO ENSAIO

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

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

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

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

3 DESCRIÇÃO DO PRODUTO

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

- uma região do gene do **antigénio T grande** de BKV, detetada no Canal **BKV**; a sonda é estabilizada por MGB, inativada pelo Eclipse Dark Quencher® e identificada pelo corante FAM.
- Controlo Interno, específico para o**promotor e a região 5' UTR**do**gene da beta-globina humana**, detetado no Canal**IC**; a sonda é estabilizada pelo MGB, inativada pelo Eclipse Dark Quencher e identificada pelo corante AquaPhluor® 525 (AP525).

A**BKV Q-PCR Mix**também contém tampão, cloreto de magnésio, trifosfatos nucleótidos, fluoróforo AP593 (usado em vez de ROX ou Cy5) como referência passiva para normalizar a 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**BKV ELITe MGB Kit**contém reagentes suficientes para**96 testes**no**ELITe InGenius**, no**ELITe BeGenius**e no**MyGeniusPRO,com 20**µL usados por reação.

O produto**BKV ELITe MGB Kit**contem reagentes suficientes para**100 testes noutros sistemas,** com**20**µL usados por reação.

NOTE
É necessário um fator de conversão para exprimir os resultados da análise quantitativa em unidades internacionais do BKV de acordo com o "1st WHO International Standard for BK virus DNA" (NIBSC código 14/212, Reino Unido).

4 MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Table 1

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
BKV Q-PCR Mix ref. RTS175PLD	Mistura de reagentes para o tubo de PCR em tempo real com tampa NATURAL	**4 x 540 µL**	**-**

5 MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- Câmara de fluxo laminar.

- Luvas de nitrilo sem pó descartáveis ou material semelhante.

- Misturador de vórtice.

- Microcentrífuga de bancada (~5.000 RPM).

- Microcentrífuga de bancada (~13.000 RPM).

- Micropipetas e pontas esterilizadas com filtro de aerossóis ou pontas esterilizadas de deslocação positiva (intervalo de volume: 0,5 - 1000 µL).

- Tubos com tampa de parafuso esterilizados de 2,0 mL (Sarstedt, ref. 72.694.005).

- Tubos com tampa de parafuso esterilizados de 0,5 mL (Sarstedt, ref. 72.730.005).

- Água de grau de biologia molecular.

6 OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

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

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

Table 2

Instrumentos e software	Produtos e reagentes
ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA ref. INT030) **ELITe InGenius Software** versão 1.4.0 (ou superior) **BKV ELITe_STD**, protocolo do ensaio com parâmetros para a análise dos Calibradores **BKV ELITe_PC**, protocolo de ensaio p com parâmetros para análise do Positive Control **BKV ELITe_NC**, protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Negative Control **BKV ELITe_PL_200_100** protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostra de plasma **BKV ELITe_U_200_100** protocolos de ensaio com parâmetros para análise de amostra de urina **BKV ELITe_WB_200_100** protocolos de ensaio com parâmetros para análise de amostra do sangue total	**BKV - ELITe Standard** (EG SpA, ref. STD175PLD) **BKV - ELITe Positive Control** (EG SpA, ref. CTR175PLD) **CPE - Internal Control** (EG SpA, ref. CTRCPE) Consumíveis **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** (ver instruções de utilização do ELITe InGenius e do ELITe BeGenius)
ELITe BeGenius (EG SpA ref. INT040) **ELITe BeGenius Software** versão 2.3.0 (ou superior) **BKV ELITe_Be_STD**, protocolo de ensaio com parâmetros para a análise dos Calibradores **BKV ELITe_Be_PC**, protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Positive Control **BKV ELITe_Be_NC**, protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Negative Control **BKV ELITe_Be_PL_200_100**, protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostra de plasma **BKV ELITe_Be_U_200_100**, protocolos de ensaio com parâmetros para análise de amostra de urina **BKV ELITe_Be_WB_200_100** protocolos de ensaio com parâmetros para análise de amostra do sangue total	
MyGenius PRO (EG SpA ref: INT050). Software **MyGenius PRO** versão BB-04 (ou posterior) **BKV ELITe_My_STD,** protocolo de ensaio com parâmetros para análise dos Calibradores **BKV ELITe_My_PC,** protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Positive Control **BKV ELITe_My_NC,** protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Negative Control **BKV ELITe_My_U_IU_200_100,** protocolo de ensaio com parâmetros para análise da amostra de urina e resultado em IU/mL **BKV ELITe_My_U_cmL_200_100,** protocolo de ensaio com parâmetros para análise da amostra de urina e resultado com cópias/mL **BKV ELITe_My_PL_IU_200_100,** protocolo de ensaio com parâmetros para análise da amostra de plasma e resultado em IU/mL **BKV ELITe_My_PL_cmL_200_100,** protocolo de ensaio com parâmetros para análise da amostra de plasma e resultado em cópias/mL	**BKV - ELITe Standard** (EG SpA, ref. STD175PLD) **BKV - ELITe Positive Control** (EG SpA, ref. CTR175PLD) **Negative Control** (EG SpA, Ref. CTRNEG) **Internal Control Maxi** (EG SpA, Ref. ICMAXI) Consumíveis **MyGenius PRO** (ver instruções de utilização do MyGenius PRO)

Table 2 (continued)

Instrumentos e software	Produtos e reagentes
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, ref. 4406985) **ELITe GALAXY** (EG SpA, ref. INT020) com a **versão de software 1.3.1** (ou posterior). Protocolo de extração para o ELITe GALAXY, xNA Extraction (Universal)	**BKV - ELITe Standard** (EG SpA, ref. STD175PLD) **BKV - ELITe Positive Control** (EG SpA, ref. CTR175PLD) **CPE - Internal Control** (EG SpA, ref. CTRCPE) Consumíveis **ELITe GALAXY** (ver instruções de utilização do ELITe GALAXY) **MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL** (Life Technologies, ref. 4346906), microplacas com poços de 0,1 mL e folhas selantes adesivas para amplificação em tempo real.

7 AVISOS E PRECAUÇÕES

Este produto foi concebido para utilização exclusiva in-vitro.

7.1 Avisos e precauções gerais

- Manuseie e elimine todas as amostras biológicas como se fossem infeciosas. Evite o contacto direto com as amostras biológicas. Evite salpicos ou vaporizações. Tubos, pontas e outros materiais que entrarem em contacto com as amostras biológicas devem ser tratados durante, pelo menos, 30 minutos com hipoclorito de sódio (lixívia) a 3% ou em autoclave durante uma hora a 121 °C antes da eliminação.
- Manuseie e elimine todos os reagentes e todos os materiais usados na realização do ensaio como se fossem infeciosos. Evite o contacto direto com os reagentes. Evite salpicos ou vaporizações. Os resíduos devem ser manuseados e eliminados em conformidade com as normas de segurança adequadas. Os materiais combustíveis descartáveis devem ser incinerados. Os resíduos líquidos que contenham ácidos ou bases devem ser neutralizados antes da eliminação. Não permita que os reagentes de extração entrem em contacto com hipoclorito de sódio (lixívia).
- Use vestuário e luvas de proteção adequados e proteja os olhos e o rosto.
- Nunca deve pipetar soluções com a boca.
- Não coma, beba, fume ou aplique produtos cosméticos nas áreas de trabalho.
- Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.
- Elimine os reagentes remanescentes e os desperdícios em conformidade com os regulamentos em vigor.
- Leia atentamente todas as instruções fornecidas antes de efetuar o ensaio.
- Durante a realização do ensaio, siga as instruções fornecidas com o produto.
- Não utilize o produto após a data de validade indicada.
- Use apenas os reagentes fornecidos com o produto e os recomendados pelo fabricante.
- Não use reagentes de lotes diferentes.
- Não use reagentes de outros fabricantes.

7.2 Avisos e precauções para biologia molecular

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

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

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

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

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

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

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

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

7.3 Avisos e precauções específicos para os componentes

Table 3

Componente	Temperatura de armazenamento	Utilização a partir da primeira abertura	Ciclos de congelação/descongelação	Estabilidade de bordo (ELITe InGenius e ELITe BeGenius)	Estabilidade no bloco (MyGenius PRO)
BKV Q-PCR Mix	-20°C ou inferior (protegido da luz)	60 dias	até cinco	até cinco sessões separadas* de três horas cada ou até 7 horas consecutivas (2 sessões consecutivas de 3 horas cada e o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão)	até 7 horas consecutivas ou até 3 horas consecutivas por cinco vezes*

*com congelamento intermédio.

8 AMOSTRAS E CONTROLOS para o ELITe InGenius, ELITe BeGenius E MyGenius PRO

8.1 Amostras e protocolos de ensaio

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

Table 4

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

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

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

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

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

Table 5

Amostra	Instrumento	Nome do protocolo de ensaio	Relatório	Características
Plasma em EDTA	ELITe InGenius	BKV ELITe_PL_200_100	cópias/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
	ELITe BeGenius	BKV ELITe_Be_PL_200_100	cópias/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
Urina	ELITe InGenius	BKV ELITe_U_200_100	cópias/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
	ELITe BeGenius	BKV ELITe_Be_UL_200_100	cópias/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

Table 5 (continued)

Amostra	Instrumento	Nome do protocolo de ensaio	Relatório	Características
Sangue total	ELITe InGenius	BKV ELITe_WB_200_100	cópias/mL ou IU/mL	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
	ELITe BeGenius	BKV ELITe_Be_WB_200_100	cópias/mL ou IU/mL	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

UI, unidades internacionais

Para realizar os testes de amostras no **MyGenius PRO**, devem ser usados os seguintes protocolos de ensaio. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os ELITe MGB Kits e o **MyGenius PRO** com as matrizes indicadas.

Table 6 Protocolos de ensaio para o BKV ELITe MGB Kit e o MyGeniusPRO

Amostra	Instrumento	Nome do protocolo de ensaio	Relatório	Características
Urina	MyGenius PRO	BKV ELITe_My_U_IU_200_100	IU/mL	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
Urina	MyGenius PRO	BKV ELITe_My_U_cmL_200_100	cópias/mL	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

Table 6 Protocolos de ensaio para o BKV ELITe MGB Kit e o MyGeniusPRO (continued)

Amostra	Instrumento	Nome do protocolo de ensaio	Relatório	Características
Plasma	MyGenius PRO	BKV ELITe_My_PL_IU_200_ 100	IU/mL	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
Plasma	MyGenius PRO	BKV ELITe_My_PL_cmL_ 200_ 100	cópias/mL	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

NOTE

Verifique se o tubo primário e o volume da amostra são compatíveis com o ELITe InGenius, o ELITe BeGenius ou o MyGenius PRO, seguindo as instruções de utilização dos instrumentos.

O volume da amostra num tubo primário varia consoante o tipo de tubo carregado. Consulte as instruções de utilização do kit de extração para obter mais informações sobre como preparar e realizar o procedimento de extração.

Se necessário, 200 µL de amostra devem ser transferidos para um tubo de extração (para o ELITE InGenius) ou para um tubo Sarstedt de 2 mL (para o ELITE BeGenius) e 260 µL de amostra devem ser transferidos para um tubo Sarstedt de 2 mL (para MyGenius PRO).

NOTE

A pipetagem de amostras para o **Extraction Tube (Tubo de extração)** ou para o **tubo Sarstedt de 2 mL** pode **gerar contaminação.** Utilize as pipetas adequadas e siga todas as recomendações reportadas na secção “7 AVISOS E PRECAUÇÕES page 8”.

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

Consulte "Substâncias Potencialmente Interferentes" na secção 12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO page 32 para verificar os dados relativos a substâncias interferentes.

8.2 Calibradores e controlos da PCR

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

- Para a curva de calibração, utilize os quatro níveis de produto **BKV ELITe Standard** (não fornecido com este kit) com os protocolos do ensaio **BKV ELITe_STD**, **BKV ELITe_Be_STD** ou **BKV ELITe_My_STD**.

NOTE

As concentrações de Q – PCR Standards são expressas em cópias/reação (10^5 cópias / rxn, 10^4 cópias / rxn, 10^3 cópias / rxn, 10^2 cópias /rxn). Consulte “Incerteza da curva de standard” na secção 12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO page 32.

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

- Para o Positive Control, use o produto **BKV - ELITe Positive Control** (não fornecido com este kit) com os protocolos de ensaio **BKV ELITe_PC**, **BKV ELITe_Be_PC** ou **BKV ELITe_My_PC**.
- Para o Negative Control, utilize água de qualidade para biologia molecular (não fornecida com este kit) com os protocolos de ensaio **BKV ELITe_NC**, **BKV ELITe_Be_NC** ou utilize o **Negative Control** (não fornecido com este kit) com o protocolo de ensaio **BKV ELITe_My_NC**.

NOTE

O **ELITe InGenius**, o **ELITe BeGenius** e o **MyGenius PRO** permitem a geração e o armazenamento da curva de calibração e a validação do controlo de PCR para cada lote de reagente de PCR.

NOTE

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

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

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

- se for usado um novo lote de reagentes,
- os resultados da análise de controlo da qualidade se encontrarem fora da especificação (ver o parágrafo seguinte),
- for realizada qualquer manutenção ou assistência significativa nos instrumentos **ELITe InGenius**, **ELITe BeGenius** e **MyGenius PRO**.

8.3 Controlos da qualidade

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

9 PROCEDIMENTO do ELITe InGenius

O procedimento para uso do**BKV ELITe MGB Kit** com o **ELITe InGenius** é composto por três passos:

Table 7

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

9.1 PASSO 1 – Verificação da disponibilidade do sistema

Antes de iniciar a sessão:

- ligue o **ELITe InGenius** e inicie sessão no modo “**CLOSED**” (fechado),
- no menu “Calibração” na página inicial, verifique se os Calibradores (**Q - PCR Standard**) estão aprovados e válidos (Estado) para o lote de PCR Mix a ser utilizado. Caso não haja calibradores válidos para o lote de PCR Mix, realize a calibração conforme descrito nas secções seguintes,
- no menu “Controls” (Controlos) na página inicial, verifique se os controlos de PCR (**Positive Control, Negative Control**) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de PCR Mix a ser utilizado. Caso não haja controlos de PCR válidos disponíveis para o lote da **PCR Mix** execute os controlos de PCR conforme descrito nas secções seguintes,
- selecione o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilize os Protocolos de ensaio fornecidos pela EG SpA (ver 8 AMOSTRAS E CONTROLOS para o ELITe InGenius, ELITe BeGenius E MyGenius PRO page 9).

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

9.2 PASSO 2 – Configuração da sessão

O**BKV ELITe MGB Kit** pode ser usado no **ELITe InGenius** para realizar:

A. Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR]),

B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR]),

C. Execução de calibração (apenas PCR),

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

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

NOTE

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

Antes de configurar uma execução:

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

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

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

	A. Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair +PCR])	**B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])**
1	**Identifique amostras** e, se necessário, descongele à temperatura ambiente, misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Se necessário, transfira 200 µL da amostra para um tubo de extração anteriormente identificado. **Descongele** os **tubos de CPE** necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Cada tubo é suficiente para 12 extrações.	**Descongele** o **Elution tube** (Tubo de eluição) contendo os ácidos nucleicos extraídos à temperatura ambiente. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.
2	Selecione “**Perform Run**” (Executar) a partir do ecrã “Home”.	Selecione “**Perform Run**” (Executar) a partir do ecrã “Home”
3	Certifique-se de que o “Extraction Input Volume” (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o “Extracted Elute Volume” (Volume de eluição do extraído) é de 100 µL.	Certifique-se de que o “Extraction Input Volume” (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o “Extracted Elute Volume” (Volume de eluição do extraído) é de 100 µL.
4	Para cada amostra, atribua um Track e introduza a “SampleID” (SID) digitando ou lendo o código de barras da amostra.	Para cada amostra, atribua um Track e introduza a “SampleID” (SID) digitando ou lendo o código de barras da amostra.
5	**Selecione** o **Assay Protocol** (Protocolo de ensaio) na coluna "Assay” (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").	Selecione o **Assay Protocol** (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay” (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").
6	Certifique-se de que o "Protocol" (Protocolo) apresentado é: “Extract + PCR”(Extrair + PCR).	Selecione “PCR Only” (Apenas PCR) na coluna “Protocol” (Protocolo).
7	Selecione a posição de carregamento da amostra como “Primary tube” (Tubo primário) ou “Extraction Tube” (Tubo de extração) na coluna “Sample Position” (Posição da amostra). Certifique-se de que o “**Dilution factor**” (Fator de diluição) é “**1**”.	Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna “Sample Position” (Posição da amostra) é “Elution Tube (bottom row)” (Tubo de eluição [linha inferior]). Certifique-se de que o “**Dilution factor**” (Fator de diluição) é “**1**”.
8	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.
9	**Carregue a CPE** e **PCR Mix** no “Inventory Block” (Gestor do reagente) em referência a “Load List” (Lista de carregamentos) e introduza o número de lote, data de validade e o número de reações da CPE and PCR Mix para cada tubo.	Carregue a **PCR Mix** no “Inventory Block” (Gestor do reagente) em referência a “Load List” (Lista de carregamentos) e introduza o número de lote, data de validade e o número de reações da PCR Mix para cada tubo.
10	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.
11	Verifique as pontas nos “Tip Racks” (Suporte de Ponta) na "Inventory Area” (área dos reagentes) e substitua “Tip Racks”, se necessário.	Verifique as pontas nos “Tip Racks” (Suporte de Ponta) na "Inventory Area” (área dos reagentes) e substitua “Tip Racks”, se necessário.
12	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.

	A. Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair +PCR])	**B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])**
13	**Carregue** a PCR Cassette, os cartuchos de extração Elite InGenius SP 200 e todos os consumíveis e amostras necessários para serem extraídos	**Carregue** a PCR Cassette e o Elution Tubes (Tubos de eluição com as amostras extraídas.
14	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.
15	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
16	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).

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

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

NOTE

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

NOTE

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

NOTE

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

NOTE

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

NOTE

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

NOTE

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

NOTE

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

9.3 PASSO 3 - Revisão e aprovação dos resultados

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

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

NOTE

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

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

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

9.3.1 Validação da Curva de calibração

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

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

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

NOTE

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

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

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

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

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

O software ELITe InGenius processa os resultados do Positive Control e do Negative Control e gera os Gráficos de Controlo. A aprovação do Positive Control baseia-se na avaliação da quantidade logarítmica obtida, que deve estar dentro do intervalo de quantidade logarítmica esperado (gráfico PC). Isto garante que o desempenho do sistema está dentro dos critérios de aceitação. O segundo gráfico (gráfico L-J) é dedicado exclusivamente ao acompanhamento da tendência do Positive Control ao longo do tempo. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

NOTE

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

NOTE

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

9.3.3 Validação dos resultados da amostra

O **software MyGenius PRO** interpreta os resultados de PCR para o alvo (Canal **BKV**) e do Internal Control (Canal **IC**) com os parâmetros dos protocolos de ensaio **BKV ELITe_PL_200_100**, **BKV ELITe_U_200_100** ou **BKV ELITe_WB_200_100** . Os valores de Ct do alvo resultante são convertidos em concentração.

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

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

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

3) Negative Control	Estado
BKV Negative Control	APROVADO

Os resultados da amostra são automaticamente interpretados pelo **ELITe InGenius Software** usando os parâmetros do protocolo do ensaio.

Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado.

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

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

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

Se subsistir volume da eluição suficiente, o eluato pode ser novamente testado (tal como está ou diluído) através de uma execução da amplificação no modo “PCR Only” (Apenas PCR). Se o segundo resultado for inválido, a amostra deve ser novamente testada começando a partir da extração de uma nova amostra utilizando o modo “Extract + PCR” (ver 18 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS page 57).

As amostras reportadas como “BKV: DNA Not Detected or below LoD copies/mL or IU/mL" (BKV: DNA não detetado ou abaixo de LoD cópias/mL ou IU/mL) são adequadas para análise mas não foi detetado BKV. Neste caso, a amostra pode ser negativa para ADN de BKV ou o ADN de BKV está presente numa concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver 12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO page 32).

Amostras positivas do ADN de BKV a uma concentração abaixo do Limite de Deteção (e Limite Inferior da Quantificação) do ensaio, se detetado, são relatados como “BKV:DNA Detected, quantity below LLoQ copies/mL or IU/mL” (BKV:DNA detetado, quantidade abaixo “LLoQ” cópias/mL ou IU/mL) (ver 12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO page 32).

Amostras positivas para ADN de BKV no intervalo de medição linear são detetadas e relatadas como “BKV:DNA Detected, quantity equal to “XXX” copies/mL or IU/mL” (BKV:DNA detetado, quantidade igual a “XXX” cópias/mL ou IU/mL) (ver 12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO page 32).

As amostras positivas de ADN de BKV que estejam acima do Limite Superior de Quantificação são comunicadas como “BKV:DNA Detected, quantity beyond “ULoQ” copies/mL or IU/mL” (BKV:DNA detetado, quantidade além de “ULoQ” cópias/mL ou IU/mL) (ver 12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO page 32) e não são adequadas para quantificação. Se necessário a amostra pode ser diluída antes da extração ou PCR e novamente testada de forma a serem obtidos resultados dentro do intervalo de medição linear do ensaio.

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

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

9.3.4 Elaboração do relatório do resultado da amostra

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

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

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

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

10 PROCEDIMENTO do ELITe BeGenius

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

Table 8

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

10.1 PASSO 1 - Verificação da disponibilidade do sistema

Antes de iniciar a sessão:

- ligue o **ELITe BeGenius** e inicie sessão no modo “**CLOSED**” (fechado),
- no menu “Calibrações” na página inicial, verifique se os Calibradores (**Q - PCR Standard**) estão aprovados e válidos (Estado) para o lote de **PCR Mix** a ser utilizado. Caso não haja calibradores válidos para o lote **PCR Mix**, realize a calibração conforme descrito nas secções seguintes,

- no menu “Controlos” na página inicial, verifique se os controlos de PCR (**Positive Control, Negative Control**) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de **PCR Mix** a ser utilizado. Caso não haja controlos de PCR válidos disponíveis para o lote da **PCR Mix** execute os controlos de PCR conforme descrito nas secções seguintes,
- selecione o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilize os Protocolos de ensaio fornecidos pela EG SpA (ver 8 AMOSTRAS E CONTROLOS para o ELITe InGenius, ELITe BeGenius E MyGenius PRO page 9).

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

10.2 PASSO 2 – Configuração da sessão

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

A. Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR]),

B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR]),

C. Execução de calibração (apenas PCR),

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

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

NOTE

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

Antes de configurar uma execução:

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

NOTE

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

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

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair +PCR]	**B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])**
1	**Identifique amostras** e, se necessário, descongele à temperatura ambiente, misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Se necessário, transfira 200 µL da amostra para um tubo Sarstedt de 2 mL anteriormente identificado. **Descongele** os **tubos de CPE** necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Cada tubo é suficiente para 12 extrações.	**Descongele** o **Elution tube** (Tubo de eluição) contendo os ácidos nucleicos extraídos à temperatura ambiente. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.
2	Selecione “**Perform Run**” (Executar) a partir do ecrã “Home”.	Selecione “**Perform Run**” (Executar) a partir do ecrã “Home”
3	Retire os Suportes da “Cooler Unit” e coloque-os na mesa de preparação.	Retire os “Racks” de “Lane 1, 2 and 3” (L1, L2, L3) da “Cooler Unit” e coloque-os na mesa de preparação
4	Selecione o “Run mode”: “Extract + PCR”(Extrair + PCR).	Selecione o “Run mode”: “PCR Only”.

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair +PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])
5	Carregue as amostras no “Sample Rack” (Suporte da amostras). (Nota: quando os tubos secundários “2 mL Tubes” (Tubos de 2 mL) forem carregados, use adaptadores azuis para o “Sample Rack” (Suporte de amostras).	Carregue as amostras no “Elution Rack” (Rack de eluição).
6	**Insira o “Sample Rack”** (Suporte da amostra) na “Cooler Unit” começando a partir da “Lane 5” (L5). Se necessário, insira a “Sample ID” (Identificação da amostra) (SID) para cada “Position” usada. Se forem carregados tubos secundários, assinale “2 mL Tube” (Tubo de 2 mL). Se os tubos secundários não possuírem código de barras, digite manualmente a “Sample ID”).	**Insira o “Elution Rack”** (Rack de eluição) na “Cooler Unit” começando a partir da “Lane 3” (L3). Se necessário, para cada “Position” (Posição), insira a “Sample ID” (Identificação da amostra), a “Sample matrix” (Matriz da amostra), o “Extraction kit” (Kit de extração) e o “Extracted eluate vol.” (Volume de eluato extraído).
7	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.
8	Certifique-se de que o “Extraction Input Volume” (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o “Extracted Elute Volume” (“Volume de eluição do extraído”) é de 100 µL.	Não aplicável.
9	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").
10	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.
11	Quando forem processadas mais de 12 amostras, repita o procedimento a partir do ponto 6.	Quando forem processadas mais de 12 amostras, repita o procedimento a partir do ponto 6.
12	Coloque os “Elution tubes" (Tubo de eluição) no “Elution Rack" (rack de eluição) (os tubos de eluição podem ser etiquetados com código de barras para melhorar a capacidade de localização).	Não aplicável.
13	Insira o “Elution Rack” na “Cooler Unit” começando a partir da “Lane 3” (L3). Quando mais de 12 amostras forem processadas, repita usando a “Lane 2” (L2).	Não aplicável.
14	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Não aplicável.
15	Carregue o CPE e a PCR Mix no “Reagent/Elution Rack” (Rack de reagente/eluição).	Carregue a PCR Mix no “Reagent/Elution Rack” (Rack de reagente/eluição).
16	Insira o “Reagent/Elution Rack” na “Cooler Unit” na “Lane 2” (L2) se estiver disponível, ou na “Lane 1” (L1). Se necessário, para cada PCR Mix e/ou CPE, insira o “S/N” (número de série), o “Lot No.” (número de lote), a “Exp. Date” (data de expiração) e o “T/R” (número de reações).	Insira o “Reagent/Elution Rack” na “Cooler Unit” na “Lane 2” (L2) se estiver disponível, ou na “Lane 1” (L1). Se necessário, para cada PCR Mix, insira o “S/N” (número de série), o “Lot No.” (número de lote), a “Exp. Date” (data de expiração) e o “T/R” (número de reações).
17	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.
18	Verifique as pontas nos “Tip Rack (s)” (Suporte de Ponta) na “Inventory Area” (área dos reagentes) e substitua o suporte(s) de pontas, se necessário.	Verifique as pontas nos “Tip Rack (s)” (Suporte de Ponta) na “Inventory Area” (área dos reagentes) e substitua o suporte(s) de pontas, se necessário.
19	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.
20	Coloque o “PCR Rack” com a “PCR Cassette” na Inventory Area (área dos reagentes).	Coloque o “PCR Rack” com a “PCR Cassette” na Inventory Area (área dos reagentes).
21	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair +PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])
22	Carregue o “Extraction Rack” (Rack de extração) com os cartuchos de extração “ELITe InGenius SP 200” e os consumíveis de extração necessários.	Não aplicável.
23	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
24	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).

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

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

NOTE

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

NOTE

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

NOTE

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

NOTE

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

NOTE

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

NOTE

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

NOTE

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

10.3 PASSO 3 - Revisão e aprovação dos resultados

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

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

NOTE

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

O **ELITe BeGenius** gera os resultados com o **BKV ELITe MGB Kit** através do seguinte procedimento:

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

4. Elaboração do relatório do resultado da amostra.

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

11 PROCEDIMENTO MyGenius PRO

O procedimento para utilização do**BKV ELITe MGB Kit** com o **MyGenius PRO** é composto por três passos:

Table 9

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

PASSO 1 - Verificação da disponibilidade do sistema

Antes de iniciar a sessão de testes:

- ligue o MyGenius PRO e inicie sessão; a unidade irá iniciar no modo STANDBY.
- no menu “Calibrations” (Calibrações) no ecrã inicial, verifique se os Calibradores (**Q - PCR Standard**) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de**PCR Mix**a ser utilizado. Caso não haja calibradores válidos para o lote**PCR Mix**, realize a calibração conforme descrito nas secções seguintes,
- no menu “Controls” (Controlos) no eccrã inicial, verifique se os controlos de PCR (**Positive Control, Negative Control**) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de**PCR Mix**a ser utilizado. Caso não haja controlos de PCR válidos disponíveis para o lote da**PCR Mix**execute os controlos de PCR conforme descrito nas secções seguintes,
- siga as instruções na interface gráfica do utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilize os protocolos de ensaio fornecidos pela EG SpA (ver “Amostras e Controlos”).

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

PASSO 2 – Configuração do fluxo de trabalho no sistema

O**BKV ELITe MGB Kit** pode ser usado no **MyGenius PRO** para realizar:

A. Sessão de testes de amostras (Extract + PCR [Extrair+PCR])

B. Sessão de testes de calibração (PCR Only [Apenas PCR])

C. Sessão de testes de Positive Control e Negative Control (PCR Only [apenas PCR])

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

Antes de configurar uma sessão de testes:

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

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

Para configurar um dos três tipos de sessão de testes, siga os passos abaixo diante da GUI:

	A. Sessão de testes de amostras (Extract + PCR [Extrair+PCR])	**B. Sessão de testes de calibração (PCR Only [Apenas PCR])**	**C. Sessão de testes de Positive Control e Negative Control (PCR Only [Apenas PCR])**
1	Identifique amostras e, se necessário, descongele à temperatura ambiente, misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Se o tubo primário for compatível com os suportes MyGenius PRO, insira o tubo com as amostras nos suportes; se isso não for possível, **transfira 260 µL da amostra para um tubo secundário (2 mL) previamente rotulado.** **Descongele**os**tubos**Internal Control Maxi**IC MAXI**necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos. Cada tubo é suficiente para 72 testes.	**Descongele**os**tubos de Q-PCR Standard**necessários (Cal1: Q--PCR Standard 102, Cal2: Q-PCR Standard 103, Cal3: Q-PCR Standard 104, Cal4: Q-PCR Standard 105) à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.	**Descongele os tubos de Positive Control**à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Centrifugue os**tubos deNegativeControl**durante 5 segundos.
2	Se o instrumento estiver ligado ao LIS, os códigos de barras das amostras são automaticamente lidos e reconhecidos pelo MyGenius PRO quando colocados na área de amostras. Se o instrumento não estiver ligado ao LIS, atribua manualmente as amostras utilizando as funções**ASSIGN TEST**(ATRIBUIR TESTE) ou**ASSIGN SAMPLE** (ATRIBUIR AMOSTRA) na página "Sample List" (Lista de amostras) da GUI, antes de as carregar no instrumento. Essas funções também permitem atribuir o protocolo de teste correto a cada amostra.	Carregue a PCR Mix e os tubos Q--PCR Standard no carrossel de reagentes refrigerado.	Carregue a PCR Mix e os tubosde Positive e Negative Controls no carrossel de reagentes refrigerado.
3	No modo**STANDBY**, verifique se há quantidade suficiente de consumíveis para concluir o teste e se os níveis de resíduos sólidos e líquidos são adequados para o funcionamento do instrumento. Se necessário, carregue os consumíveis necessários nas gavetas adequadas e esvazie a caixa de resíduos e o tanque de liquido. Para obter informações detalhadas sobre os procedimentos de carregamento, consulte o manual do utilizador do instrumento.	No modo**STANDBY**, verifique se há quantidade suficiente de consumíveis para concluir o teste e se os níveis de resíduos sólidos e líquidos são adequados para o funcionamento do instrumento. Se necessário, carregue os consumíveis necessários nas gavetas adequadas e esvazie a caixa de resíduos e o tanque de liquido. Para obter informações detalhadas sobre os procedimentos de carregamento, consulte o manual do utilizador do instrumento.	No modo**STANDBY**, verifique se há quantidade suficiente de consumíveis para concluir o teste e se os níveis de resíduos sólidos e líquidos são adequados para o funcionamento do instrumento. Se necessário, carregue os consumíveis necessários nas gavetas adequadas e esvazie a caixa de resíduos e o tanque de liquido. Para obter informações detalhadas sobre os procedimentos de carregamento, consulte o manual do utilizador do instrumento.
4	Prima Start (Iniciar) na página inicial e aguarde que o instrumento passe para o estado “Preparation” (Preparação) e depois para “Operation” (Funcionamento).	Prima Start (Iniciar) na página inicial e aguarde que o instrumento passe para o estado “Preparation” (Preparação) e depois para “Operation” (Funcionamento).	Prima Start (Iniciar) na página inicial e aguarde que o instrumento passe para o estado “Preparation” (Preparação) e depois para “Operation” (Funcionamento).

	A. Sessão de testes de amostras (Extract + PCR [Extrair+PCR])	B. Sessão de testes de calibração (PCR Only [Apenas PCR])	C. Sessão de testes de Positive Control e Negative Control (PCR Only [Apenas PCR])
5	Carregue a PCR Mix no carrossel de reagentes refrigerado.	Selecione “Calibration” (Calibração) a partir do ecrã “Home”	Selecione “Controls” (Controlos) a partir do ecrã “Home”
6	Reserve a abertura da porta da Área do Auto Sampler e carregue as amostras e o IC MAXI.	Selecione na página Calibration (Calibração) o tubo Q-PCR Standard carregado no passo 2 e, em seguida, prima “Order” (Pedir).	Selecione na página Control (Controlo) o Positive Control e o Negative Control carregados no passo 2 e, em seguida, prima “Order” (Pedir).
7	Feche a porta do Auto Sampler e a sessão de testes inicia-se.		

No final da sessão de testes, o restante**Q - PCR Standard**pode ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C ou menos. Evite derramar o Q - PCR Standard.

NOTE

No final da sessão de testes, a**PCRMix**pode ser retirada do instrumento, tapada e armazenada a -20 C ou abaixo ou pode ser mantida no carrossel de reagente durante até 7 horas.

Assim que é obtido um resultado, o**MyGenius PRO**permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e guardar o relatório final.

NOTE

O**Q- PCRStandard**pode ser utilizado para 4 calibrações, deixando-o no instrumento durante um máximo de 2 horas para cada calibração.

NOTE

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

NOTE

O**Positive Control**pode ser utilizado para 4 calibrações, deixando-o no instrumento durante um máximo de 3 horas para cada calibração.

NOTE

Quando necessário ou quando o instrumento o exigir, retire da gaveta do instrumento a**PCR Cassette**e os outros consumíveis têm de ser eliminados seguindo todos os regulamentos governamentais e ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

NOTE

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

PASSO 3 - Revisão e aprovação dos resultados

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

Quando a análise de cada amostra estiver concluída, os resultados podem ser visualizados no ecrã “Results” (Resultados), que apresenta os resultados e as informações sobre as amostras. A partir deste ecrã, é possível aprovar os resultados e guardar os relatórios. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

O **MyGenius PRO** gera os resultados com o **BKV ELITe MGB Kit** através do seguinte procedimento:

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

Validação da Curva de calibração

O **software MyGenius PRO** interpreta os resultados da PCR para o alvo das reações do Calibrador com os parâmetros do protocolo de ensaio **BKV ELITe_My_STD**. A Ct resultante versus a concentração produz a curva da calibração.

As curvas de calibração, específicas para o lote de reagente da PCR, são guardadas na base de dados (Calibrações) e podem ser visualizadas e aprovadas pelo utilizador, selecionando a calibração de interesse e a secção “View chart” (Ver gráfico).

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

NOTE

Se a curva de calibração não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem “Error” (Erro) no ecrã “Calibrations” (Calibrações). Neste caso, os resultados não podem ser aprovados e têm de ser repetidas as reações de amplificação do Calibrador. Além disso, se as amostras foram incluídas na sessão de testes, estas não são quantificadas: neste caso, após a repetição da calibração, todos os resultados devem ser interpretados e aprovados (ver secção dedicada aos resultados das amostras).

Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação

O **software MyGenius PRO** interpreta os resultados da PCR para o alvo do Positive Control e para o alvo do Internal Control (canal **IC**) das reações de Negative Control com os parâmetros dos protocolos de ensaio **BKV ELITe_My_PC** e **BKV ELITe_My_NC**. Os valores de Ct resultantes são convertidos em concentrações e usados para validar o sistema (lote de reagente e instrumento).

Os resultados do Positive Control e Negative Control, específicos para o lote de reagente de PCR usado, são registados na base de dados (Controlos). Estes podem ser visualizados e aprovados pelo utilizador, selecionando o controlo de interesse e a secção “View chart” (Ver gráfico).

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

O **software MyGenius PRO** processa os resultados do Positive Control e do Negative Control e gera os Gráficos de Controlo. Os resultados são analisados pelo software para garantir que os desempenhos do sistema se encontram dentro dos critérios de aceitação, mostrados nos traçados do Gráfico de controlo. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

NOTE

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

NOTE

Se os resultados do Positive Control ou do Negative Control forem inválidos e as amostras tiverem sido incluídas na mesma sessão de testes, as amostras não podem ser aprovadas. Neste caso, após a repetição dos controlos, todos os resultados têm de ser interpretados e aprovados (ver secção dedicada aos resultados das amostras).

Validação dos resultados da amostra

O **software MyGenius PRO** interpreta os resultados de PCR para o alvo (Canal **BKV**) e do Internal Control (Canal **IC**) com os parâmetros dos protocolos de ensaio **BKV ELITe_My_U_IU_200_100 and BKV ELITe_My_U_cmL_200_100, BKV ELITe_My_PL_IU_200_100 e BKV ELITe_My_PL_cmL_200_100**. Os valores de Ct do alvo resultante são convertidos em concentração.

Os resultados são mostrados no ecrã “Results” (Resultados).

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

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

Os resultados da amostra são automaticamente interpretados pelo **software MyGenius PRO** utilizando os parâmetros dos protocolos de ensaio se os resultados dos respetivos controlos e calibração forem aprovados. Se as calibrações e os controlos válidos não estiverem presentes e aprovados quando os resultados das amostras são obtidos, as amostras não podem ser interpretadas e aprovadas: neste caso, as calibrações e os controlos têm de ser aprovados e, em seguida, cada amostra tem de ser interpretada na secção “sample list” (lista de amostras) e aprovada na secção “Results” (resultados) utilizando botões específicos.

Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado.

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

Resultado da execução da amostra	**Interpretação**
BKV:DNA DETECTED, QUANTITY EQUAL TO XXX COPIES/ML OR IU/ML (BKV:DNA DETETADO, QUANTIDADE IGUAL A XXX CÓPIAS/ML OU IU/ML)	**Foi detetado ADN do BKV** na amostra no intervalo de medição de ensaio, a sua concentração é mostrada.
BKV:DNA DETECTED, QUANTITY BELOW “LLOQ” COPIES/ML OR IU/ML (BKV:DNA DETETADO, QUANTIDADE ABAIXO “LLOQ” CÓPIAS/ML OU IU/ML)	**Foi detetado ADN do BKV** na amostra, a sua concentração é inferior ao ensaio Limite inferior de quantificação
BKV:DNA DETECTED, QUANTITY BEYOND “ULOQ” COPIES/ML OR IU/ML (BKV:DNA DETETADO, QUANTIDADE ALÉM DE “ULOQ” CÓPIAS/ML OU IU/ML)	**Foi detetado ADN do BKV** na amostra, a sua concentração é superior ao ensaio Limite superior de quantificação
BKV:DNA NOT DETECTED OR BELOW “LOD” COPIES/ML OR IU/ML (BKV:DNA NÃO DETETADO OU ABAIXO DE “LOD” CÓPIAS/ /ML OU IU/ML)	**Não foi detetado ADN de BKV** na amostra**.** A amostra é negativa para ADN do BKV ou a sua concentração está abaixo do limite de deteção do ensaio.
INVALID - RETEST SAMPLE (INVÁLIDO- -TESTAR NOVAMENTE A AMOSTRA)	**Resultado do ensaio inválido** devido a falha do Controlo Interno (extração incorreta, transferência de inibidores). O teste deve ser repetido.

Amostras indicadas como “INVALID - RETEST SAMPLE” (INVÁLIDO - TESTAR NOVAMENTE AMOSTRA): caso, o ADN do Controlo Interno não foi detetado eficientemente devido a problemas nos passos de colheita, extração ou PCR da amostra (por ex. amostragem incorreta, degradação ou perda do ADN durante a extração ou inibidores na eluição), que pode causar resultados incorretos. Neste caso, a amostra deve ser novamente testada, a começar pela extração de uma nova amostra.

As amostras reportadas como “BKV: DNA NOT DETECTED OR BELOW “LOD” COPIES/ML OR IU/ML" (BKV: DNA NÃO DETETADO OU ABAIXO DE “LOD” CÓPIAS/ML OU IU/ML) são adequadas para análise mas não foi detetado BKV. Neste caso, a amostra pode ser negativa para ADN de BKV ou o ADN de BKV está presente numa concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver 12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO page 32).

Amostras positivas do ADN de BKV a uma concentração abaixo do Limite de Deteção (e Limite Inferior da Quantificação) do ensaio, se detetado, são relatadas como “BKV:DNA DETECTED, QUANTITY BELOW “LLOQ” COPIES/ML OR IU/ML” (BKV: DNA DETETADO, QUANTIDADE ABAIXO DE “LLOQ” CÓPIAS/ML OU IU/ML) (ver 12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO page 32).

Amostras positivas para ADN de BKV no intervalo de medição linear são detetadas e relatadas como “BKV:DNA DETECTED, QUANTITY EQUAL TO XXX COPIES/ML OR IU/ML” (BKV: DNA DETETADO, QUANTIDADE IGUAL A XXX CÓPIAS/ML OU IU/ML) (ver 12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO page 32).

As amostras positivas de ADN de BKV que estejam acima do Limite Superior de Quantificação são relatadas como “BKV: DNA DETECTED, QUANTITY BEYOND “ULOQ” COPIES/ML OR IU/ML” (BKV: DNA DETETADO, QUANTIDADE ALÉM DE “ULOQ” CÓPIAS/ML OU IU/ML) (ver 12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO page 32) e não são adequadas para quantificação. Se necessário a amostra pode ser diluída antes da extração ou PCR e novamente testada de forma a serem obtidos resultados dentro do intervalo de medição linear do ensaio.

NOTE

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

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

Elaboração do relatório do resultado da amostra

Os resultados da amostra são guardados na base de dados e os relatórios podem ser exportados como “Summary Report” (Relatório de resumo) e “Details Report” (Relatório de detalhes).

O “Details Report” (Relatório de detalhes) apresenta os resultados detalhados para cada amostra selecionada (SID).

O “Summary Report” (Relatório de resumo) apresenta os resultados de interpretação para todas as amostras selecionadas (SID).

O "Details Report" (Relatório de detalhes) e o "Summary Report" (Relatório de resumo) podem ser impressos e assinados por pessoal autorizado.

12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO

12.1 Limite de deteção (LdD)

O Limite de Deteção (LdD) do ensaio em associação com matrizes de plasma EDTA, urina e sangue total EDTA foi determinado nos instrumentos ELITe InGenius ou ELITe BeGenius, testando um painel de matrizes negativas para BKV reforçadas com o material de referência de BKV (1st WHO International Standard for BK Virus DNA, NIBSC ref.ª 14/212, Reino Unido). Foi executada a análise de regressão Probit nos resultados, e estimou-se como LdD a concentração correspondente a 95% de probabilidade de um resultado positivo.

Os resultados de ambas as matrizes são comunicados nas tabelas seguintes.

Table 10 Limite de deteção com o ELITe InGenius (IU/mL)

Matriz	LoD	intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
urina	142 IU/mL	110 IU/mL	222 IU/mL
plasma	215 IU/mL	168 IU/mL	319 IU/mL
sangue total	538 IU/mL	337 IU/mL	1128 IU/mL

A sensibilidade analítica como cópias/mL para cada matriz é calculada através da aplicação do fator de conversão específico reportado no parágrafo 12.9 Fator de conversão para unidades internacionais page 39

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

Table 11 Limite de deteção com o ELITe InGenius (cópias/mL)

Matriz	LoD	intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
urina	89 cópias/mL	69 cópias/mL	139 cópias/mL
plasma	165 cópias/mL	129 cópias/mL	245 cópias/mL
sangue total	117 cópias/mL	73 cópias/mL	245 cópias/mL

O valor do LdD calculado foi verificado para cada matriz testando no Elite InGenius e no ELITe BeGenius um universo de cada matriz reforçado com material de referência certificado de BKV à concentração declarada.

Os resultados obtidos confirmaram a concentração declarada para o alvo de BKV ELITe MGB Kit em ambos os ELITe InGenius e ELITe BeGenius para cada matriz.

Os valores LdD calculado para ELITe InGenius e matrizes de urina e plasma também são válidos para MyGenius PRO.

12.2 Inclusividade: Eficiência de deteção em diferentes estirpes ou isolados

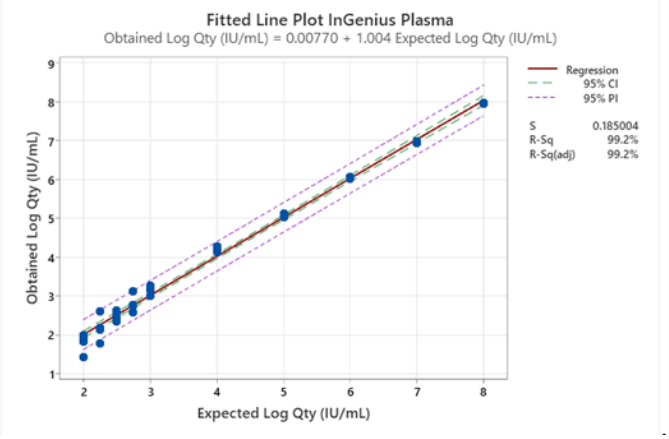
A Inclusividade do ensaio, como eficiência de deteção para diferentes estirpes ou isolados de poliomavírus BK foi avaliada por análise *in silico*. A análise revelou a conservação da sequência e a ausência de mutações significativas. Assim, espera-se uma deteção eficiente para a maioria das estirpes ou isolados.

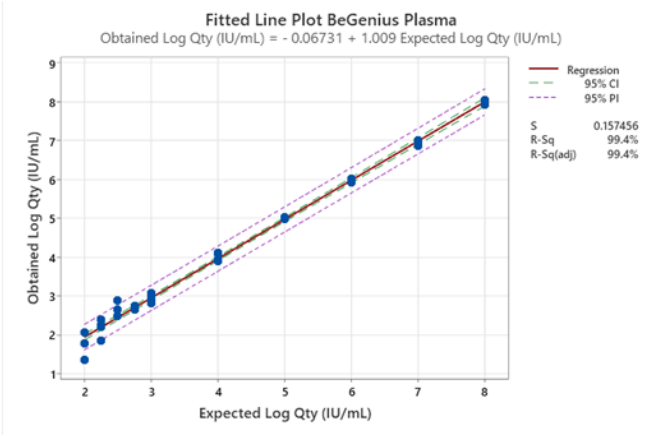
12.3 Intervalo de medição linear e Limites de quantificação

O intervalo de medição linear do ensaio foi determinado em associação com matrizes de plasma EDTA, urina e sangue total EDTA no **ELITe InGenius** e no **ELITe BeGenius** usando um painel de diluição de material de referência de BKV (BKV Virus Culture Fluid, Heat inactivated, ZeptoMetrix) numa matriz negativa para ADN de BKV.

Os resultados de cada matriz são comunicados nos parágrafos seguintes.

Plasma:





O intervalo de medição linear como cópias/mL para plasma em EDTA é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado no parágrafo 12.9 . page 39

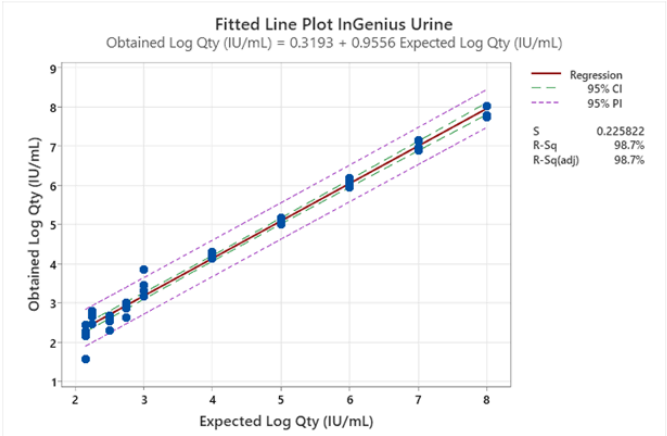
Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

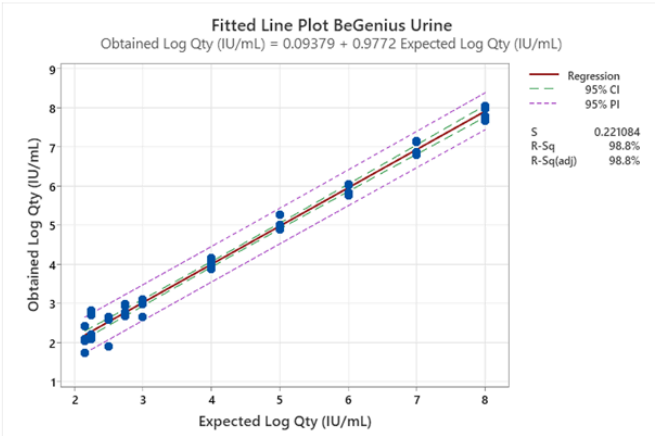
Table 12 Intervalo de medição linear para amostras de plasma e o ELITe InGenius e ELITe BeGenius

Unidade	Limite inferior	Limite superior
IU/mL	215	130000000
cópias/mL	165	100000000

O intervalo de medição linear determinado para o ELITe InGenius e o ELITe BeGenius e matriz de plasma também é válido para o MyGenius PRO.

Urina:





O intervalo de medição linear como cópias/mL para urina é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado no ponto 12.9 Fator de conversão para unidades internacionais page 39

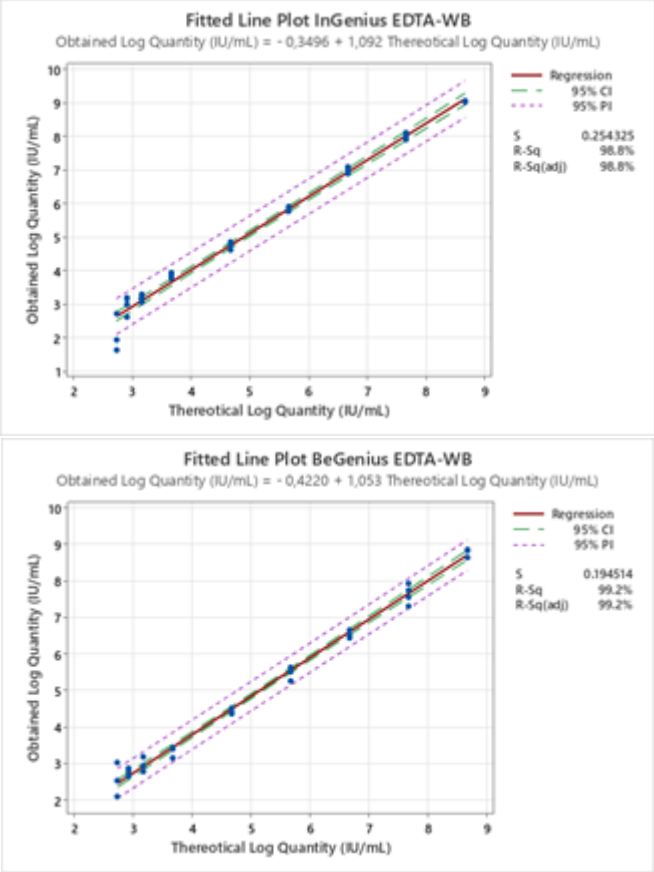
Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Table 13 Intervalo de medição linear para amostras de urina e o ELITe InGenius e ELITe BeGenius

Unidade	Limite inferior	Limite superior
IU/mL	142	160000000
cópias/mL	89	100000000

O intervalo de medição linear determinado para o ELITe InGenius e ELITe BeGenius e matriz de urina também é válido para o MyGenius PRO.

Sangue total:



O intervalo de medição linear como IU/mL para sangue total em EDTA é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado no parágrafo 12.9 Fator de conversão para unidades internacionais page 39

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Table 14 Intervalo de medição linear para amostras de sangue total EDTA e ELITe InGenius e ELITe BeGenius

Unidade	Limite inferior	Limite superior
IU/mL	538	460.000.000
cópias/mL	117	100.000.000

12.4 Incerteza da curva de standard

O valor da incerteza da curva de standard foi calculado combinando os erros aleatórios (DP) das quantificações de todos os níveis e multiplicando o fator de cobertura k = 2 (incerteza combinada alargada) e é igual a 0,2146 Log cópias / reação.

Table 15

Níveis da curva de standard	Teórico	Medido	Tendências	SD	Incerteza combinada alargada
	Log c/rxn	Log c/rxn			
BKV Q - PCR Standard 10^5	5,0000	4,9845	0,0155	0,0417	0,2146
BKV Q - PCR Standard 10^4	4,0000	4,0022	-0,0022	0,0349	
BKV Q - PCR Standard 10^3	3,0000	3,0051	-0,0051	0,0500	
BKV Q - PCR Standard 10^2	2,0000	2,0471	-0,0471	0,0778	

12.5 Organismos potencialmente interferentes: Reatividade cruzada

A potencial reatividade cruzada com outros organismos não pretendidos do produto BKV ELITe MGB Kit foi avaliada por análise *in silico* das sequências disponíveis na base de dados de nucleótidos EBI ENA. A análise não demonstrou homologias significativas com outros organismos não pretendidos (vírus, bactérias e fungos). Por conseguinte, não é esperada qualquer reatividade cruzada ou interferência.

12.6 Substâncias potencialmente interferentes: Inibição

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

Os resultados de cada matriz são comunicados nas tabelas seguintes.

Table 16 Plasma

Substância	Pos./Rep.	Resultado
Azitromicina	5 / 5	Sem interferência
Ganciclovir	5 / 5	Sem interferência
Ribavirina	5 / 5	Sem interferência
Abacavir	5 / 5	Sem interferência
Cidofovir	5 / 5	Sem interferência
Ciclosporina A	5 / 5	Sem interferência
Bilirrubina	5 / 5	Sem interferência
EDTA	5 / 5	Sem interferência
Heparina	5 / 5	Sem interferência

As substâncias testadas não interferem com a amplificação de BKV ou do Controlo Interno.

Table 17 Urina

Substância	Pos. / Rep.	Resultado
Azitromicina	5 / 5	Sem interferência
Bilirrubina	5 / 5	Sem interferência

Table 17 Urina (continued)

Substância	Pos. / Rep.	Resultado
Sangue Total	5 / 5	Sem interferência
Cloridrato de fenazopiridina	5 / 5	Sem interferência

As substâncias testadas não interferem com a amplificação de BKV ou do Controlo Interno.

Table 18 Sangue total

Substância	Pos. / Rep.	Resultado
Sangue altamente hemolítico	5 / 5	Sem interferência
Sangue mediamente hemolítico	5 / 5	Sem interferência
Sangue hemolítico baixo	5 / 5	Sem interferência
Triglicéridos	5 / 5	Sem interferência
Bilirrubina	5 / 5	Sem interferência
Heparina	5 / 5	Sem interferência
Ganciclovir	5 / 5	Sem interferência
Cidofovir	5 / 5	Sem interferência
Ribavirina	5 / 5	Sem interferência
Azitromicina	5 / 5	Sem interferência
Vancomicina	5 / 5	Sem interferência
Amoxicillina	5 / 5	Sem interferência
Fluconazol	5 / 5	Sem interferência
Hidrocortisona	5 / 5	Sem interferência
Ciclosporina A	5 / 5	Sem interferência

As substâncias testadas não interferem com a amplificação de BKV ou do Controlo Interno.

12.7 Repetibilidade

A repetibilidade intra-sessão e inter-sessão do ensaio foi avaliada no ELITe InGenius e no ELITe BeGenius através da análise de um painel de amostras de plasma colhido em EDTA, incluindo uma amostra negativa e duas amostras enriquecidas com material de referência certificado de BKV (1st WHO International Standard for BKV virus DNA, NIBSC, código 14/212, Reino Unido).

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

Table 19 Repetibilidade intrasessão no ELITe InGenius

Amostra	BKV				
	N	Ct médio	SD	% CV	% Concordância
Negativo	8	-	-	-	100%
3 x LdD	8	36,66	0,45	0,82	100%
10 x LdD	8	34,88	0,56	1,33	100%

Table 20 Repetibilidade intrasessão no ELITe BeGenius

Amostra	BKV				
	N	Ct médio	SD	% CV	% Concordância
Negativo	8	-	-	-	100%
3 x LdD	8	37,09	0,52	1,40	100%
10 x LdD	8	35,45	0,31	0,88	100%

Um exemplo dos resultados da repetibilidade inter-sessão são mostrados nas tabelas seguintes.

Table 21 Repetibilidade intersessão no ELITe InGenius

Amostra	BKV- Dias 1-2				
	N	Ct médio	DP de Ct	% CV Ct	% Concordância
Negativo	16	-	-	-	100%
3 x LdD	16	36,36	0,52	1,43	100%
10 x LdD	16	34,40	0,68	1,96	100%

Table 22 Repetibilidade intersessão no ELITe BeGenius

Amostra	BKV - Dias 1-2				
	N	Ct médio	DP de Ct	% CV Ct	% Concordância
Negativo	16	-	-	-	100%
3 x LdD	16	36,68	0,71	1,94	100%
10 x LdD	16	34,98	0,55	1,57	100%

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

12.8 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do ensaio foi avaliada no ELITe InGenius e no ELITe BeGenius através da análise de um painel de amostras de plasma colhido em EDTA negativas ou enriquecidas com BKV (1st WHO International Standard for BKV virus DNA, NIBSC, código 14/212, Reino Unido).

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

Table 23 Reprodutibilidade inter-instrumento no ELITe InGenius

Amostra	BKV				
	N	Ct médio	SD	% CV	% Concordância
Negativo	8	-	-	-	100%
3 x LdD	8	36,72	0,30	0,82	100%
10 x LdD	8	30,89	0,41	1,33	100%

Table 24 Capacidade de reprodução interinstrumento no ELITe BeGenius

Amostra	BKV				
	N	Ct médio	SD	% CV	% Concordância
Negativo	8	-	-	-	100%
3 x LdD	8	36,87	0,58	1,56	100%
10 x LdD	8	34,86	0,25	0,72	100%

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

Table 25 Repetibilidade interlote no ELITe InGenius

Amostra	BKV				
	N	Ct médio	SD	% CV	% Concordância
Negativo	8	-	-	-	100%
3 x LdD	8	36,94	0,36	0,82	100%
10 x LdD	8	35,07	0,28	1,33	100%

Table 26 Repetibilidade interlote no ELITe BeGenius

Amostra	BKV				
	N	Ct médio	SD	% CV	% Concordância
Negativo	8	-	-	-	100%
3 x LdD	8	36,81	0,66	1,56	100%
10 x LdD	8	35,01	0,41	0,72	100%

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

12.9 Fator de conversão para unidades internacionais

O fator de conversão para relatar os resultados quantitativos em unidades internacionais / mL começando por cópias / mL, foi calculado, para cada matriz, usando o material de referência calibrado e certificado “1st WHO International Standard for BKV virus DNA” (1.º Standard Internacional da OMS para ADN do vírus BK) (NIBSC, código 14/212, Reino Unido).

Os resultados de cada matriz são resumidos na tabela seguinte

Table 27 Fator de conversão para unidades internacionais

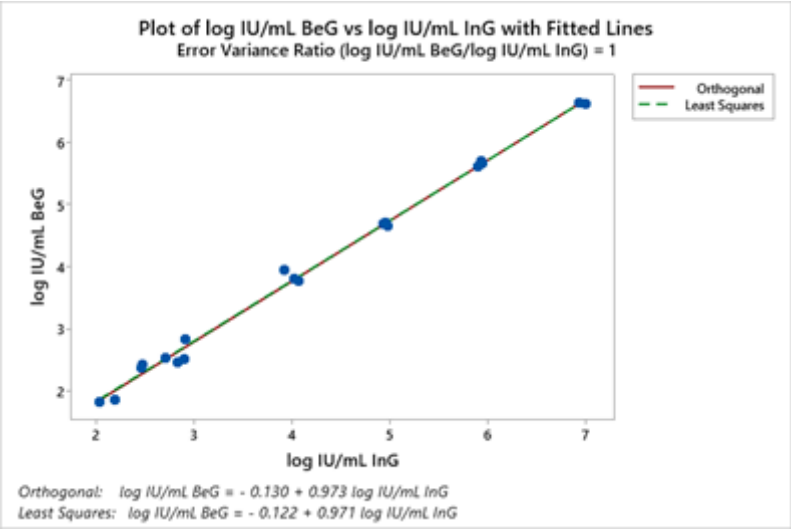
Matriz	Fc (IU/cópias)
Plasma	1,3
Urina	1,6
Sangue total	4,6

Os fatores de conversão para unidades internacionais calculados para ELITe InGenius e matrizes de urina e plasma também são válidos para MyGenius PRO.

O fator de conversão para relatar os resultados quantitativos em Unidades internacionais/mL a partir de cópias/ /mL, foi verificado para cada matriz nos instrumentos **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** usando material de referência calibrado e certificado (1st WHO International Standard, NIBSC). Os resultados obtidos foram analisados por regressão ortogonal e linear para calcular a correlação.

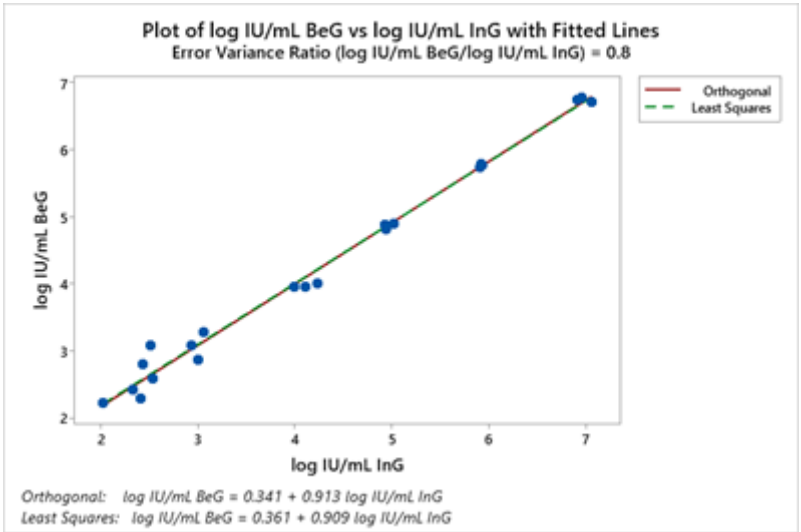
Os resultados de cada matriz são comunicados nos parágrafos seguintes.

Plasma



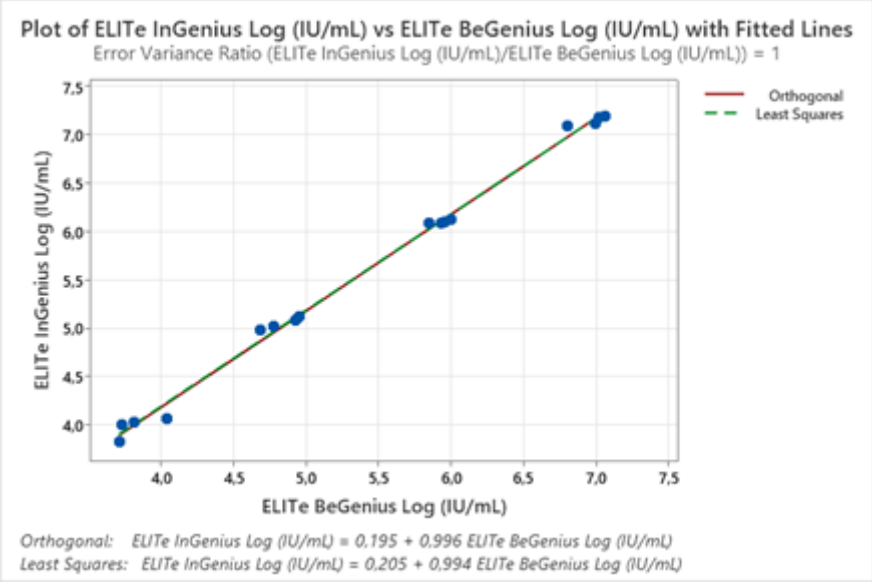
A análise de regressão ortogonal gerou um declive igual a -0,130 (95% CI: - 0,263; – 0,002) e um declive igual a 0,973 (95% CI: 0,944 - 1,001).

Urina:



A análise de regressão ortogonal gerou um declive igual a 0,341 (95% CI: 0,152 – 0,529) e um declive igual a 0,913 (95% IC: 0,872 - 0,954).

Sangue total:



A análise de regressão ortogonal gerou um declive igual a 0,195 (95% CI: 0,0174; 0,3733) e um declive igual a 0,996 (95% CI: 0,9639 – 1,0284).

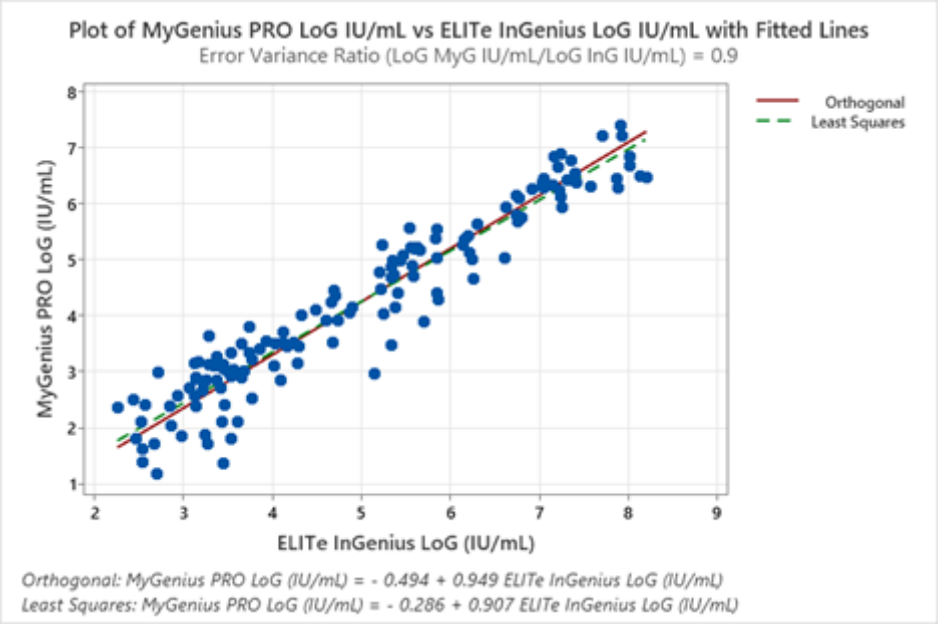
12.10 MyGenius PRO: correlação do método

A análise de correlação dos diferentes métodos foi avaliada no MyGenius PRO através da análise de amostras BKV de doentes cuja carga viral se encontrava dentro do intervalo de medição dos métodos de referência (ELITe InGenius). Os resultados obtidos com o MyGenius PRO e o método de referência (ELITe InGenius) foram analisados por Deming e Regressão Linear.

Urina

O estudo de correlação foi efetuado num local em 137 amostras clínicas positivas de urina, certificadas como positivas para o ADN do BKV ou reforçadas com material de referência, utilizando o ELITe InGenius como comparador.

Os resultados estão resumidos na figura seguinte.

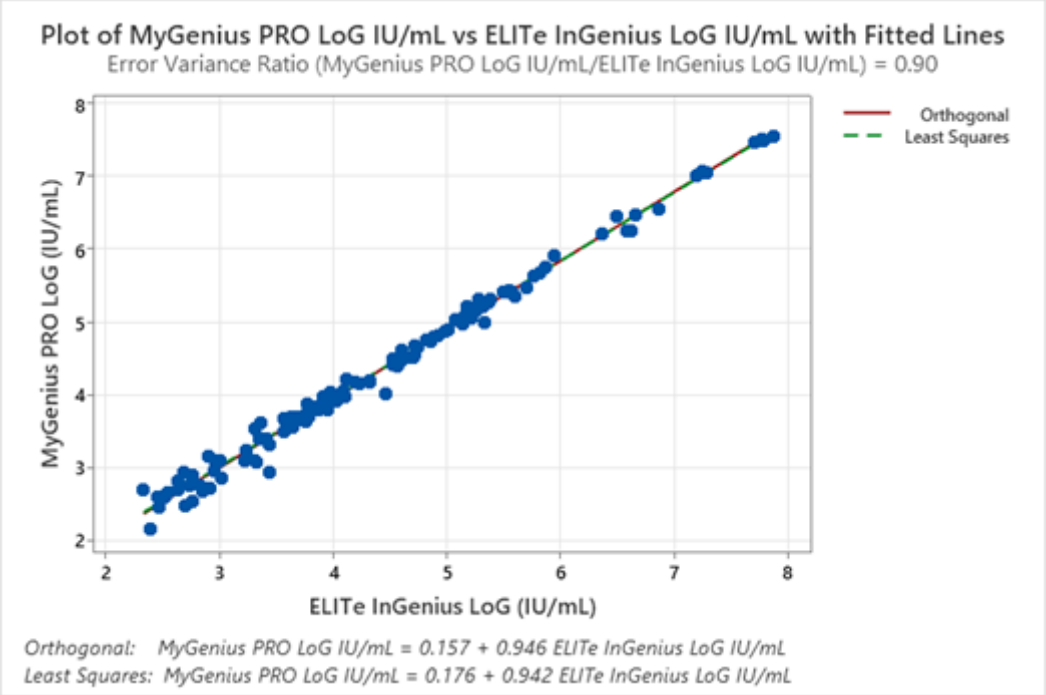


A análise de regressão Deming gerou uma interceção equivalente a -0,494 (95% CI -0,7502; -0,2371) e um declive igual a 0,949 (95% CI: 0,8996 – 0,9982). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0,913.

Plasma

O estudo de correlação foi efetuado num local em 122 amostras clínicas positivas de plasma, certificadas como positivas para o ADN do BKV ou reforçadas com material de referência, utilizando o ELITe InGenius como comparador.

Os resultados estão resumidos na figura seguinte.



A análise de regressão Deming gerou uma interceção igual a 0,1573 (95% CI: 0,0829; 0,2316) e um declive igual a 0,9464 (95% IC: 0,9304 – 0,9624). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0,991.

12.11 Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi avaliada em associação com o **ELITe InGenius** ou o **ELITe BeGenius,** através da análise de amostras clínicas certificadas negativas ou presumivelmente negativas para ADN de BKV. Dado que o **ELITe BeGenius** revelou desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITe InGenius**, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a especificidade de diagnóstico do ensaio obtido em associação com o ELITe InGenius também se aplica ao ELITe BeGenius e vice versa.

Dado que o **MyGenius PRO** revelou desempenhos analíticos equivalentes ao ELITe InGenius em associação com a matriz de urina e a matriz de plasma, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos e urina e plasma também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a especificidade do diagnóstico do ensaio obtida em associação com o ELITe InGenius também se aplica ao MyGenius PRO.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 28 Especificidade do diagnóstico

Amostras	N	Positivo	Negativo	% de especificidade do diagnóstico
Plasma colhido em EDTA negativo para ADN de BKV	79	3	76	**96,2%**
Urina sem conservantes negativa para ADN de BKV	68	0	68	**100%**
Sangue total colhido em EDTA negativo para ADN de BKV	80	0	80	100%

O valor-limite de Ct do IC foi definido para 35 para as amostras de plasma colhidas em EDTA e urina sem conservantes quando testadas com o ELITe InGenius, no ELITe BeGenius e no MyGenius PRO.

O valor-limite de Ct do IC foi definido para 35 para as amostras de sangue total colhidas em EDTA quando testadas com o ELITe InGenius e o ELITe BeGenius.

12.12 Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada em associação com o **ELITe InGenius** ou o **ELITe BeGenius** analisando amostras clínicas certificadas positivas para ADN de BKV ou reforçadas com material de referência. Dado que o **ELITe BeGenius** revelou desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITe InGenius**, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a sensibilidade de diagnóstico do ensaio obtido em associação com o ELITe InGenius também se aplica ao ELITe BeGenius e vice versa.

Dado que o **MyGenius PRO** revelou desempenhos analíticos equivalentes ao ELITe InGenius em associação com a matriz de urina e a matriz de plasma, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos e urina e plasma também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a sensibilidade do diagnóstico do ensaio obtida em associação com o ELITe InGenius também se aplica ao MyGenius PRO.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 29 Sensibilidade de diagnóstico

Amostras	N	Positivo	Negativo	% de sensibilidade de diagnóstico
Plasma colhido em EDTA e positivo para ADN de BKV	34	34	0	100%
Plasma colhido em EDTA e reforçado para BKV	24	24	0	
Total	58	58	0	
Urina sem conservantes positiva para ADN de BKV	67	67	0	100%
Sangue total colhido em EDTA e positivo para ADN de BKV	52	52	0	100%
Sangue total colhido em EDTA e reforçado para BKV	28	28	0	

NOTE

Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e os instrumentos estão registados no Ficheiro técnico do produto para o "BKV ELITe MGB® Kit", FTP175PLD.

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

13.1 Amostras

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

Table 30

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

13.2 Substâncias interferentes

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

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

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

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

13.3 Controlos de amplificação

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

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

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

13.4 Controlos da qualidade

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

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

14.1 Definição da sessão de amplificação em tempo real

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

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

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

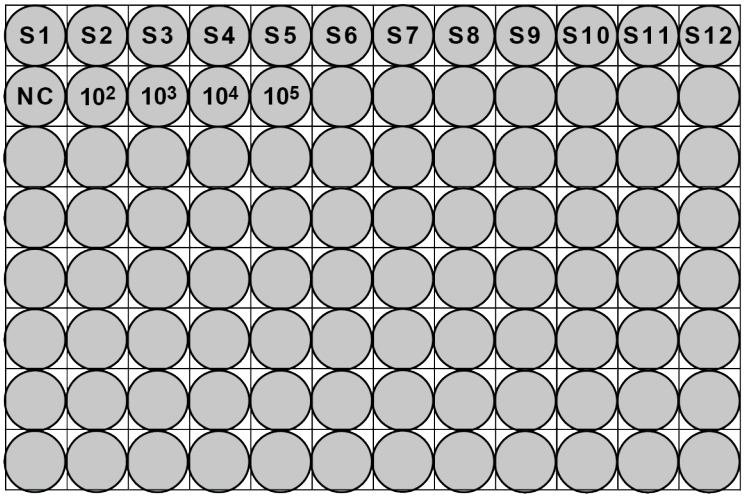
- ligar o ciclo térmico em tempo real, ligar o computador, executar o software dedicado e abrir uma sessão "quantificação absoluta";

- definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda BKV com o “dispositivo de relatório” = "FAM" e o "disposição de extinção" = “nenhum" (não fluorescente) e dar-lhe o nome "BKV";
- definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda de Internal Control com o “dispositivo de relatório” = "VIC" (AP525 é semelhante ao VIC) e o "disposição de extinção" = “nenhum " (não fluorescente) e dar-lhe o nome "IC";
- para cada furo em utilização na microplaca, defina (Inspetor do furo) o "detetor" (tipo de fluorescência a ser medida), a "referência passiva" = "ROX" (é usado AP593 em vez de ROX, normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (amostra, controlo de amplificação negativo, controlo de amplificação positivo ou padrão de quantidade conhecido). Adicione esta informação à**Ficha de trabalho**anexada no final deste manual ou imprima a preparação da microplaca. A**Ficha de trabalho**deve ser atentamente seguida durante a transferência da mistura de reação e das amostras para os furos.

NOTE

Para determinar o título ADN na amostra inicial, prepare uma série de reações com o**Q -PCR Standards** (10^5cópias, 10^4cópias, 10^3cópias, 10^2cópias) para obter a**Curva standard.**

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



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

10^2: 10^2cópias de standard;**10^3**: 10^3cópias de standard;**10^4**: 10^4cópias de standard;**10^5**: 10^5cópias standard.

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

- adicione à fase de amplificação o passo (Adicionar passo) de**extensãoa72 °C**;

NOTE

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

- modifique o tempo como indicado na tabela**"Ciclotérmico"**;
- 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**30µL**;

Table 31 Ciclo térmico 7300

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

Quando é usado um**7500Fast DxReal-Time PCRInstrument**.

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 BKV com o “dispositivo de relatório” = "FAM" e o "disposição de extinção" = “nenhum" (não fluorescente) e dar-lhe o nome "BKV";
- definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda de Internal Control com o “dispositivo de relatório” = "VIC" (AP525 é semelhante ao VIC) e o "disposição de extinção" = “nenhum " (não fluorescente) e dar-lhe o nome "IC";
- para cada furo em utilização na microplaca, defina (Inspetor do furo) o "detetor" (tipo de fluorescência a ser medida), a "referência passiva" = "Cy5" (é usado AP593 em vez de Cy5, para a normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (amostra, controlo de amplificação negativo, controlo de amplificação positivo ou padrão de quantidade conhecido). Adicione esta informação à**Ficha detrabalho**anexada no final deste manual ou imprima a preparação da microplaca. A **Ficha de trabalho** deve ser atentamente seguida durante a transferência da mistura de reação e das amostras para os furos.

NOTE

Para determinar o título ADN na amostra inicial, prepare uma série de reações com o Q-PCRStandards(10^5cópias, 10^4cópias, 10^3cópias, 10^2cópias) para obter a**Curva standard.**

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

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

- adicione à fase de amplificação o passo (Adicionar passo) de**extensãoa72°C**;

NOTE

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

- modifique o tempo como indicado na tabela**"Ciclotérmico"**;
- 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**30µL**;
- opcional: adicione a fase de dissociação (Adicionar fase de dissociação) e defina a temperatura de**40 °C**a**80° C**

.

Table 32 Ciclo térmico 7500

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

14.2 Preparação da sessão de PCR em tempo real

(executado pelo instrumento **ELITe GALAXY**)

Para realizar a configuração da sessão de PCR:

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

NOTE

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

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

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

NOTE

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

Após a configuração da PCR realizada no instrumento:

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

NOTE

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

14.3 Definições gerais para a análise dos resultados

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

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

NOTE

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

- Defina manualmente os limites para os detetores

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

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

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

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

14.4 Análise qualitativa dos resultados

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

Table 33

Detetor FAM de "BKV" da reação de positive control	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETO

Se o resultado do **Positive Control** for **Ct > 25** ou**Ct Indeterminado**para o detetor FAM "BKV"**,** a sessão é inválida e tem de ser repetida a partir do passo da PCR. Isto pode indicar uma contaminação que pode conduzir a resultados incorretos e falsos positivos.

NOTE

Quando o produto for usado para a quantificação de ADN de BKV, foram preparadas as reações de**Q - PCR Standard**em vez da reação do**Positive Control**. Neste caso, valide a amplificação e a deteção através da referência à reação de amplificação de**Q - PCR Standard 10^5**(**Ct ≤ 25**).

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

Table 34

Detetor FAM de "BKV" de reação do negative control	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct não determinado	**NEGATIVO**	**CORRETO**

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

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

NOTE

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

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

Table 35

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

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

Um resultado da amostra de**Ct indeterminado**para o BKV e**Ct ≤ 35**para o controlo interno é um resultado válido e indica que não foi detetado ADN de BKV na amostra. A amostra pode conter ADN de BKV ou conter ADN de BKV a uma concentração inferior ao limite de deteção do produto (ver15 Características de desempenho page 51).Um resultado da amostra de**Ct determinado (Ct ≤ 45)**para BKV e**Ct> 35**,**Ct indeterminado**ou**Ct ≤ 35**para o IC é um resultado válido e indica que foi detetado ADN de BKV na amostra

NOTE

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

NOTE

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

14.5 Análise quantitativa dos resultados

Após a análise qualitativa dos resultados, pode ser executada a análise quantitativa das amostras positivas.

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

Table 36

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

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

Table 37

Resultado da amostra para o detetor FAM “BKV”	Cópias BKV por reação
Quantidade > 1×10^6	MAIS DE 1×10^6
$1 \times 10^1 \leq$ Quantidade $\leq 1 \times 10^6$	= Quantidade
Quantidade < 1×10^1	MENOS DE 10

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

Table 38

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

em que:

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

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

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

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

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

Para converter a quantidade de amostra de cópias/mL para IU/mL, multiplique o valor de cópias/mL pelo**fator deconversão (Fc)**. O Fc foi calculado usando material de referência certificado calibrado ("1st WHO International Standard for BK Virus DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques” (1.º Standard internacional da OMS para o ADN do BKV com técnicas de amplificação de ácido nucleico), NIBSC) (ver15 Características de desempenho page 51).

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

Table 39

Matriz	Método de extração de ácido nucleico	Ve/ (Vc x Va x Ep)	Fórmula a quantificar Nc (cópias/mL)	Fc (IU/cópias)	Fórmula a quantificar Nc (IU/mL)
plasma	ELITe GALAXY	35	35 x quantidade	4,1	143,5 x quantidade

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

15.1 Sensibilidade analítica: Limite de deteção (LdD)

O Limite de Deteção (LdD) do ensaio em associação com plasma EDTA foi verificado nos instrumentos ELITe GALAXY e ABI 7500 testando um painel de matrizes negativas para BKV reforçadas com o material de referência de BKV (1st WHO international standard for BKV virus DNA, NIBSC código 14/212, Reino Unido). Foi executada a análise de regressão Probit nos resultados, e estimou-se como LdD a concentração correspondente a 95% de probabilidade de um resultado positivo.

O resultado é comunicado na tabela seguinte.

Table 40 Limite de deteção para amostras de plasma e ELITe GALAXY

% Positividade	LdD	intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95%	**189 cópias/mL**	119 cópias/mL	462 cópias/mL
95%	**779 IU/mL**	490 IU/mL	1903 IU/mL

O LdD como cópias/mL para cada matriz é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado no parágrafo 15.7 Conversão para unidades internacionais page 54

15.2 Intervalo de medição linear

O intervalo de medição linear do ensaio foi determinado no **ABI 7500 Fast Dx** usando um painel de diluição de ADN do plasmídeo contendo o produto de amplificação.

O intervalo de medição linear como cópias/mL é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado no ponto 15.7 Conversão para unidades internacionais page 54.

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Table 41 Intervalo de medição linear para amostras de plasma EDTA e o ABI 7500

Unidade de medida	limite inferior	limite superior
IU/mL	41	41.000.000
cópias/reação	10	1.000.000

15.3 Marcadores potencialmente interferentes: Reatividade cruzada

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

A ausência de reatividade cruzada com potenciais organismos interferentes também foi verificada através da análise de um painel de organismos não pretendidos (ATCC, NIBSC) a título alto.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 42

Organismo	Pos. / Rep.	Resultado
HSV1	0 / 3	Sem reatividade cruzada
HSV2	0 / 3	Sem reatividade cruzada

Table 42 (continued)

Organismo	Pos. / Rep.	Resultado
CMV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
EV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
VZV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
ADV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
EBV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
JCV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
HHV6	0 / 3	Sem reatividade cruzada

Todos os marcadores potencialmente interferentes testados revelaram que não há reatividade cruzada para a amplificação do alvo de BKV utilizando o BKV ELITe MGB Kit.

15.4 Marcadores potencialmente interferentes: Inibição

A inibição potencial dos organismos não pretendidos que podem ser encontrados em amostras clínicas foi avaliada para o ensaio através da análise de um painel de organismos não pretendidos em amostras positivas para BKV, de diferentes fornecedores (ATCC, NIBSC).

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 43

Organismo	Pos. / Rep.	Resultado
HSV1	3 / 3	Sem interferência
HSV2	3 / 3	Sem interferência
CMV	3 / 3	Sem interferência
EV	3 / 3	Sem interferência
VZV	3 / 3	Sem interferência
ADV	3 / 3	Sem interferência
EBV	3 / 3	Sem interferência
JCV	3 / 3	Sem interferência
HHV6	3 / 3	Sem interferência

Todos os organismos potencialmente interferentes testados revelaram que não há interferência com a deteção e quantificação do alvo de BKV usando o BKV ELITe MGB Kit.

15.5 Repetibilidade

A repetibilidade na mesma execução, entre execuções e entre dias do ensaio foi avaliada no ABI 7500 por análise de um painel de amostras reforçado com ADN do plasmídeo contendo o produto da amplificação de BKV e uma amostra negativa.

Um exemplo dos resultados da repetibilidade na mesma execução (numa sessão) é mostrado nas tabelas seguintes.

Table 44 Repetibilidade na mesma execução no ABI 7500

Amostra cópias/reação	BKV			
	Pos. / Rep.	Ct médio	SD	% CV
50.000 alvo + 150.000 IC	12 / 12	23,89	0,15	0,64
5.000 alvo + 150.000 IC	12 / 12	27,07	0,10	0,37
500 alvo + 150.000 IC	12 / 12	30,41	0,17	0,56
10 alvo + 150.000 IC	12 / 12	37,97	0,92	2,43
150.000 IC	0 / 12	-	-	-

Um exemplo dos resultados da repetibilidade entre execuções (em duas sessões) é mostrado nas tabelas seguintes.

Table 45 Repetibilidade entre execuções no ABI 7500

Amostra cópias/reação	BKV			
	Pos. / Rep.	Ct médio	SD	% CV
50.000 alvo + 150.000 IC	24/24	23,91	0,13	0,53
5.000 alvo + 150.000 IC	24/24	27,05	0,11	0,41
500 alvo + 150.000 IC	24/24	30,40	0,20	0,66
10 alvo + 150.000 IC	24/24	36,62	0,70	1,91
150.000 IC	0 / 24	-	-	-

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

15.6 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do ensaio foi avaliada no ABI 7500 através da análise dos resultados de 10 testes de CQ do produto BKV ELITe MGB Kit.

Um resumo da análise dos resultados do valor Ct do alvo BKV e do Internal Control amplificados com o BKV ELITe MGB Kit é apresentado nas tabelas abaixo:

Table 46 Reprodutibilidade no ABI 7500

Amostra cópias/reação	N	Ct médio	SD	% CV	Resultado
100.000 alvo	30	22,70	0,34	1,51	Passou
50.000 alvo + 150.000 IC	30	23,54	0,33	1,39	Passou
5.000 alvo + 150.000 IC	30	26,81	0,40	1,49	Passou
500 alvo + 150.000 IC	30	30,18	0,47	1,54	Passou
10 alvo + 150.000 IC	90	36,16	0,67	1,86	Passou
150.000 IC	30	22,76	0,25	1,09	Passou
6.000 IC	90	28,11	0,32	1,15	Passou

15.7 Conversão para unidades internacionais

O fator de conversão para unidade internacional do BKV ELITe MGB Kit e do componente do produto “BKV ELITe Standard” em associação com o ELITe GALAXY e o ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument foi calculado analisando um painel de diluições em série (passos de 0,5 Log) do “1st WHO International Standard for BK Virus DNA” (NIBSC, Reino Unido, código 14/212) em plasma negativo para o ADN do BKV colhido em EDTA.

O fator de conversão foi calculado como o anti-log da média das diferenças (10^{Md}) entre o valor Log Iu/mL atribuído e o valor Log cópias/mL medido e resultou em 4,12 IU/cópia para o plasma colhido em EDTA.

15.8 Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

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

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte

Table 47 Especificidade do diagnóstico

Amostra	N	positivo	negativo	% de especificidade do diagnóstico
Plasma colhido em EDTA e negativo para ADN de BKV	52	0	52	100 %

15.9 Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade do diagnóstico do ensaio, bem como a confirmação de amostras clínicas positivas foi avaliada analisando em associação com o ELITe GALAXY e o ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument amostras certificadas positivas para ADN de BKV e amostras reforçadas.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 48 Sensibilidade de diagnóstico

Amostras	N	positivo	negativo	% de sensibilidade de diagnóstico
Plasma colhido em EDTA e positivo para ADN de BKV	9	9	0	100 %
Plasma colhido em EDTA e reforçado para BKV	42	42	0	
Total	51	51	0	

NOTE

Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e os instrumentos estão registados no Ficheiro técnico do produto "BKV ELITe MGB® Kit", FTP 175PLD.

16 REFERÊNCIAS

S. W. Aberle et al. (2002) *J Clin Virology* 25: S79 - S85

C. N. Kotton et al. (2025) Transplantation 109: 1066-1110

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

17 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Utilize este produto apenas com as seguintes amostras clínicas:

- plasma colhido em EDTA (apenas ELITe InGenius, ELITe BeGenius, MyGenius PRO e ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument).
- urina (apenas ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO)
- sangue total colhido em EDTA (apenas ELITe InGenius, ELITe BeGenius)

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

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

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

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

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

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

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

Devido à sua elevada sensibilidade analítica, o método de PCR em tempo real suscetível de contaminação a partir de amostras positivas, controlos positivos e produtos de PCR. Estas contaminações cruzadas podem causar resultados falsos positivos. O formato do produto foi concebido para reduzir este fenómeno, mas apenas as boas práticas laboratoriais e o cumprimento destas instruções de utilização o podem evitar.

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

Este produto requer o uso de equipamento de proteção individual que seja adequado para o processamento de amostras biológicas potencialmente infeciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

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

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

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

Um resultado negativo obtido com este produto indica que o ADN do alvo não foi detetado no ADN extraído da amostra; no entanto, não pode negligenciar-se o facto de o ADN do alvo ter um título mais baixo que o limite de deteção do produto (ver12 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITe InGenius, ELITe BeGenius e MyGenius PRO page 32). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

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

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

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

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

18 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

ELITe InGenius e ELITE BeGenius

Table 49

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

Table 50

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

Table 51

Reação da amostra inválida	
Causas possíveis	**Soluções**
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da Q-PCR Mix, do Controlo Interno e da amostra. Verifique os volumes da Q-PCR Mix do Controlo Interno e da amostra.
Degradação da PCR Mix.	Não use a Q-PCR Mix durante mais de 5 sessões independentes (3 horas cada na Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit). Não utilize a Q-PCR Mix durante mais de 3 sessões consecutivas (7 horas no bloco de refrigeração da Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit). Não deixe a Q-PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos. Utilize um novo tubo da Q-PCR Mix.
Degradação do Controlo Interno.	Utilize um tubo novo de Internal Control.
Inibição devido a substâncias interferentes na amostra.	Repita a amplificação de amostra eluída como está ou com uma diluição 1:2 em água de grau de biologia molecular numa sessão “PCR Only” (apenas PCR). Repita a extração da amostra com uma diluição 1:2 em água de qualidade para biologia molecular numa sessão “Extract + PCR” (Extrair + PCR). Para amostras de LBA/AB, realize ou repita a liquefação da amostra primária conforme indicado em 8 AMOSTRAS E CONTROLOS para o ELITe InGenius, ELITe BeGenius E MyGenius PRO page 9
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 52

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

Table 53

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

Table 54

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

MyGenius PRO

Table 55

Reação do Q-PCR Standard, curva standard ou reação do Controlo Positivo inválida	
Causas possíveis	**Soluções**
Erro na configuração do instrumento.	Verifique os volumes da Q-PCR Mix, dos Q-PCR Standards e do Positive Control. É importante que os tubos utilizados no MyGenius PRO não tenham sido utilizados anteriormente por outras plataformas ou para definir sessões em plataformas abertas, pois o instrumento lê a etiqueta e atribui automaticamente o número máximo de réplicas que podem ser executadas se esse tubo nunca tiver sido carregado no MyGenius PRO. Portanto, se for utilizado um tubo que não seja novo, o volume poderá não ser suficiente.
Degradação da PCR Mix.	Não utilize a Q-PCR Mix durante mais de 7 horas no carrossel ou durante mais de 3 horas no carrossel por cinco vezes. Não deixe a Q-PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos. Utilize um novo tubo da Q-PCR Mix.
Degradação dos Q-PCR Standards ou do Controlo Positivo.	Não use o Q-PCR Standard durante mais de 4 sessões independentes (2 horas cada no carrocel). Não use o Controlo Positivo para mais de 4 sessões independentes (3 horas cada no carrocel). Use tubos novos de Q-PCR Standards ou Positive Control.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 56

Reação de Negative Control inválida	
Causas possíveis	**Soluções**
Erro na configuração do instrumento.	Verifique os volumes da Q-PCR Mix e do Negative Control. É importante que os tubos utilizados no MyGenius PRO não tenham sido utilizados anteriormente por outras plataformas ou para definir sessões em plataformas abertas, pois o instrumento lê a etiqueta e atribui automaticamente o número máximo de réplicas que podem ser executadas se esse tubo nunca tiver sido carregado no MyGenius PRO. Portanto, se for utilizado um tubo que não seja novo, o volume poderá não ser suficiente.
Contaminação do Negative Control.	Não use o Negative Control para mais do que 1 sessão e durante mais de 8 horas. Utilize um tubo novo de Negative Control.
Contaminação da PCR Mix.	Utilize um novo tubo da Q-PCR Mix.
Contaminação da área de extração, dos Racks, do Inventory Block (Gestor do reagente) ou da Cooler Unit.	Limpe as superfícies com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos e as pontas utilizadas.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 57

Reação da amostra inválida	
Causas possíveis	**Soluções**
Erro na configuração do instrumento.	Verifique os volumes da Q-PCR Mix, do Internal Control e das amostras. É importante que os tubos utilizados no MyGenius PRO não tenham sido utilizados anteriormente por outras plataformas ou para definir sessões em plataformas abertas, pois o instrumento lê a etiqueta e atribui automaticamente o número máximo de réplicas que podem ser executadas se esse tubo nunca tiver sido carregado no MyGenius PRO. Portanto, se for utilizado um tubo que não seja novo, o volume poderá não ser suficiente.
Degradação da PCR Mix.	Não utilize a Q-PCR Mix durante mais de 7 horas no carrossel ou durante mais de 3 horas no carrossel por cinco vezes. Não deixe a Q-PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos. Utilize um novo tubo da Q-PCR Mix.
Degradação do Controlo Interno.	Não use o Negative Control durante mais de 8 horas. Utilize um tubo novo de Internal Control.
Inibição devido a substâncias interferentes na amostra.	Repita a extração e amplificação da amostra. Repita a extração e amplificação da amostra com uma diluição 1:2 em água de qualidade para biologia molecular.
Concentração demasiado alta do alvo na amostra ou amostra com sinal de fluorescência anómalo.	Se for necessário um valor de Ct, repita a extração e amplificação da amostra com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 58

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

Table 59

Erro no cálculo de Ct	
Causas possíveis	**Soluções**
Concentração demasiado alta do alvo na amostra ou amostra com sinal de fluorescência anómalo.	Se uma amplificação significativa aparecer no traçado da PCR, o resultado deve ser considerado positivo. Se nenhuma amplificação aparecer no traçado da PCR, o resultado deve ser considerado negativo ou inválido. Se for necessário um valor de Ct, repita a extração e amplificação da amostra com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular.

Table 60

Elevada taxa anómala de resultados positivos na mesma sessão (reações com valores de Ct recentes semelhantes)	
Causas possíveis	**Soluções**
Contaminação entre amostras durante os passos pré-analíticos.	Limpe a micropipeta com uma solução de hipoclorito de sódio (lixívia) a 3% nova ou detergente de ADN/ARN após usar a pipeta em cada amostra. Não usar pipetas Pasteur. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. Introduza amostras no final do dia.
Contaminação pelo ambiente laboratorial.	Limpe todas as superfícies em contacto com o operador e as amostras (incluindo as pipetas) com uma solução de hipoclorito de sódio a 3% (lixívia) nova ou produto de limpeza de ADN/ARN. Realize um ciclo de descontaminação U.V. Utilize um novo tubo de Q-PCR Mix e/ou Controlo Interno

Plataforma aberta

Table 61

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

Table 62

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

Table 62 (continued)

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

Table 63

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

Table 64

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

Table 65

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

19 SÍMBOLOS

REF	Número de catálogo.
	Limite máximo da temperatura.
LOT	Código de lote.
	Prazo de validade (último dia do mês).
IVD	Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*.
CE 0123	Cumprimento dos requisitos dos Regulamentos IVDR 2017/746/CE relativo a dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*. Certificação emitida pela TÜV Süd Product Service GmbH,Alemanha.
UDI	Identificação única do dispositivo
	Contém suficiente para "N" testes.
	Consultar as instruções de utilização.
CONT	Conteúdo.
	Manter afastado da luz solar.
	Fabricante.

20 NOTIFICAÇÃO PARA OS UTILIZADORES

Qualquer incidente grave ocorrido relacionado com o dispositivo deve ser comunicado ao fabricante e às autoridades competentes do Estado-Membro em que o utilizador e/ou o paciente se encontram localizados. Para informar a ELITechGroup S. p. A., fabricante deste dispositivo, utilize o seguinte endereço de e-mail: egspa.vigilance@elitechgroup.com.

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

21 NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA

Este produto contém reagentes fabricados pela Promega Corporation e fornecidos à ELITechGroup S.p.A. para utilização exclusiva como componentes de kits de diagnóstico da marca ELITech. Os reagentes só podem ser utilizados dentro deste kit. Não são concedidos quaisquer direitos ou licenças adicionais - expressos ou implícitos - para qualquer utilização, modificação ou revenda dos reagentes fora deste kit.

Os reagentes de deteção ELITe MGB® e as plataformas ELITech (ELITe InGenius®, ELITe BeGenius®, MyGenius PRO®) estão protegidos por patentes concedidas e pedidos pendentes.

Qualquer utilização dos reagentes ou dados relacionados fora do âmbito deste kit requer autorização prévia por escrito da ELITechGroup S.p.A.

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

As tecnologias ELITe InGenius®, ELITe BeGenius®e MyGenius PRO® estão cobertas por patentes e pedidos pendentes.

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

MGB®, Eclipse Dark Quencher®, AquaPhluor®, ELITe MGB®, o logotipo ELITe MGB®, ELITe InGenius®, ELITe BeGenius® e o MyGenius PRO® (nome de registo ELIVERSE®) são marcas registadas do ELITechGroup na União Europeia.
QIAsymphony® é uma marca comercial registada da QIAGEN GmbH.
Ficoll® é uma marca comercial registada da GE Healthcare Bio-Sciences AB.

Appendix A BKV ELITe MGB Kit usado em associação com as plataformas Genius series®



CAUTION

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

Utilização prevista

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

O ensaio é validado em associação com os instrumentos **ELITe InGenius®** e **ELITe BeGenius®** automatizados e integrados para extração, PCR em tempo real e interpretação de resultados, utilizando amostras humanas de plasma colhido em EDTA, urina colhida sem conservantes e sangue total colhido em EDTA.

O ensaio foi também validado em associação com o instrumento **MyGenius PRO®** (nome de registo ELIVERSE®), sistemas automatizados e integrados para a extração, a PCR em tempo real e a interpretação dos resultados, usando amostras humanas de plasma colhido em EDTA e urina colhida em conservantes.

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

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

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

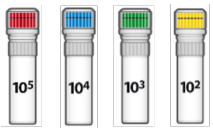
Sequência amplificada

Sequência	Gene	Fluoróforo	Canal
Alvo	Gene do antigénio T grande	FAM	BKV
Controlo Interno	Betaglobina	AP525	IC

Matriz validada

- **Plasma** colhido em EDTA
- **Urina** sem conservantes
- **Sangue total** colhido em EDTA

Conteúdo do Kit e produtos relacionados

BKV ELITe MGB Kit	BKV ELITe Standard	BKV- ELITe Positive Control
 X 4	 X 2	 X 2
PCR Mix pronta a utilizar 4 tubos de 540 µL 96 reações por kit 5 ciclos de congelação-descongelação por tubo, usado no instrumento	Pronta a utilizar, 4 níveis: 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 2 conjuntos de 4 tubos de 200 µL 8 reações por kit 4 ciclos de congelação-descongelação por tubo, usado no instrumento	Ready-to-use PC 2 tubos de 160 µL 8 reações por kit 4 ciclos de congelação-descongelação por tubo, usado no instrumento

Prazo de conservação máximo: **24 meses**

Temperatura de armazenamento: **-20 °C**

Outros produtos necessários não fornecidos no kit

• Instrumento ELITe InGenius: INT030. • Instrumento ELITe BeGenius: INT040. • ELITe InGenius SP 200: INT032SP200.	• CPE - Internal Control: CTRCPE Consumíveis **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** (ver instruções de utilização do ELITe InGenius e do ELITe BeGenius)

Protocolo do ELITe InGenius e do ELITe BeGenius

› Volume da amostra › Volume CPE › Volume de eluição total	200 µL(InGenius e BeGenius) 10 µL 100 µL	› Volume de entrada de PCR eluato › Q—PCR Mix volume › Frequência dos controlos › Frequência da calibração	20 µL 20 µL 15 dias 60 dias

Desempenhos ELITe InGenius e ELITe BeGenius

Matriz	Limite de deteção		Especificidade do diagnóstico	Sensibilidade de diagnóstico	Linearidade (IU/mL)		Fator de conversão (IU / cópias)
	IU/mL	cópias/mL			IU/mL	cópias/mL	
Plasma	215 IU/mL	165 cópias/ /mL	96,2 %	100 %	215→ 13,0 x 10^7	165→ 10,0 x 10^7	1,3
Urina	142 IU/mL	89 cópias/ /mL	100 %	100 %	142→ 16,0 x 10^7	89→ 10,0 x 10^7	1,6
Sangue total	538 IU/mL	117 cópias/ /mL	100 %	100 %	538→ 46,0 x 10^7	117→ 10,0 x 10^7	4,6

Preparação da amostra

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

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

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

Procedimentos ELITe InGenius

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

Antes da análise

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

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

1. Selecione “Perform Run” (Executar) no ecrã tátil e, a seguir, clique no modo de execução “Extract + PCR” (Extrair +PCR)	**2.** Insira o rack de amostras com as amostras com código de barras na Cooler Unit. A leitura do código de barras já se encontra ativada	**3.** Verifique os volumes de extração: Entrada: “200 µL”, eluato: “100 µL”
4. Selecione o “Assay protocol” (Protocolo de ensaio) de interesse BKV ELITe_PL_200_100 ou BKV ELITe_U_200_100 ou BKV ELITe_WB_200_100 **Nota:** Se for realizada uma segunda extração, repita os passos 2 a 4	**5.** Imprima as etiquetas para colocar um código de barras nos tubos de eluição vazios. Carregue os tubos no rack de eluição e insira-o na Cooler Unit	**6.** Carregue a PCR Mix e o Internal Control no Reagent/Elution Rack (Rack de reagente/eluição). e insira-o na Cooler Unit
7. Carregue o “PCR Rack” (Rack de PCR) com “PCR Cassette” e o “Extraction Rack” (Rack de extração) com os cartuchos de extração “ELITe InGenius SP 200” e os consumíveis de extração necessários	**8.** Feche a porta. Iniciar a execução	**9.** Visualize, aprove e guarde os resultados

NOTE

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

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

1. Selecione “Perform Run” (Executar) no ecrã tátil	**2.** Verifique os volumes de extração: Entrada: “200 µL”, eluição: “100 µL”	**3.** Leia os códigos de barras das amostras com um leitor de códigos de barras manual ou escreva a identificação da amostra
4. Selecione o protocolo de ensaio de interesse: BKV ELITe_PC e BKV ELITe_NC ou BKV ELITe_STD, ou BKV ELITe_PL_200_100, BKV ELITe_U_200_100 ou BKV ELITe_WB_200_100	**5.** Selecione o método “PCR Only” (Apenas PCR) e a posição da amostra “Elution Tube” (Tubo de eluição)	**6.** Carregue a PCR Mix no Inventory Block (Gestor do reagente)
7. Carregar: Rack de PCR Cassette e suporte de tubos de eluição com o ácido nucleico extraído	**8.** Feche a porta. Iniciar a execução	**9.** Visualize, aprove e guarde os resultados

Procedimentos ELITe BeGenius

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

Antes da análise

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

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

1. Selecione “Perform Run” (Executar) no ecrã tátil e, a seguir, clique no modo de execução “Extract + PCR” (Extrair +PCR)	**2.** Insira o rack de amostras com as amostras com código de barras na Cooler Unit. A leitura do código de barras já se encontra ativada	**3.** Verifique os volumes de extração: Entrada: “200 µL”, eluato: “100 µL”
4. Selecione o “Assay protocol” (Protocolo de ensaio) de interesse BKV ELITe_Be_PL_200_100 ou BKV ELITe_Be_U_200_100 ou BKV ELITe_WB_200_100 **Nota:** Se for realizada uma segunda extração, repita os passos 2 a 4	**5.** Imprima as etiquetas para colocar um código de barras nos tubos de eluição vazios. Carregue os tubos no rack de eluição e insira-o na Cooler Unit	**6.** Carregue a PCR Mix e o Internal Control no Reagent/Elution Rack (Rack de reagente/eluição). e insira-o na Cooler Unit
7. Carregue o “PCR Rack” (Rack de PCR) com “PCR Cassette” e o “Extraction Rack” (Rack de extração) com os cartuchos de extração “ELITe InGenius SP 200” e os consumíveis de extração necessários	**8.** Feche a porta. Iniciar a execução	**9.** Visualize, aprove e guarde os resultados

NOTE

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

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

1. Selecione “Perform Run” (Executar) no ecrã tátil	**2.** Carregue os tubos com código de barras do ácido nucleico extraído ou dos controlos/calibradores no rack de eluição e insira-o na Cooler Unit	**3.**Para Standards e Controlos: para cada “Position” (Posição) introduza o “Reagent name” (Nome do reagente) e o “S/N” (número de série), o “Lot No.” (número de lote), a “Exp.Date” (data de validade) e o “T/R” (número de reações). Para os eluatos: para cada “Position” (Posição), insira a “Sample ID” (Identificação da amostra), a “Sample matrix” (Matriz da amostra), o “Extraction kit” (Kit de extração) e o “Extracted eluate vol.” (Volume de eluato extraído).
4. Selecione o “Assay protocol” (Protocolo de ensaio) de interesse: BKV ELITe_PC e BKV ELITe_NC ou BKV ELITe_STD ou BKV ELITe_PL_ 200_100 ou BKV ELITe_U_200_100.	**5.** Carregue a PCR Mix no rack de reagente/eluição e insira-o na Cooler Unit. Carregue as pontas de filtro e o rack de PCR com “PCR Cassette”.	**6.** Feche a porta. Iniciar a execução.
7. Visualize, aprove e guarde os resultados.		

Appendix B BKV ELITe MGB Kit utilizado em associação com MyGeniusPRO



CAUTION

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

Utilização prevista

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

O ensaio é validado em associação com os instrumentos **ELITe InGenius®** e **ELITe BeGenius®** automatizados e integrados para extração, PCR em tempo real e interpretação de resultados, utilizando amostras humanas de plasma colhido em EDTA, urina colhida sem conservantes e sangue total colhido em EDTA.

O ensaio foi também validado em associação com o instrumento **MyGenius PRO®** (nome de registo ELIVERSE®), sistemas automatizados e integrados para a extração, a PCR em tempo real e a interpretação dos resultados, usando amostras humanas de plasma colhido em EDTA e urina colhida em conservantes.

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

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

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

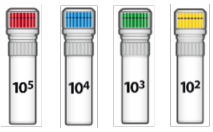
Sequência amplificada

Sequência	Gene	Fluoróforo	Canal
Alvo	Gene do antigénio T grande	FAM	BKV
Controlo Interno	Betaglobina	AP525	IC

Matriz validada

- **Plasma** colhido em EDTA
- **Urina** sem conservantes

Conteúdo do Kit e produtos relacionados

BKV ELITe MGB Kit	BKV ELITe Standard	BKV- ELITe Positive Control
 X 4	 X 2	 X 2
PCR Mix pronta a utilizar 4 tubos de 540 µL 96 reações por kit 5 ciclos de congelação-descongelação por tubo, usado no instrumento	Pronta a utilizar, 4 níveis: 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 2 conjuntos de 4 tubos de 200 µL 8 reações por kit 4 ciclos de congelação-descongelação por tubo, usado no instrumento	Ready-to-use PC 2 tubos de 160 µL 8 reações por kit 4 ciclos de congelação-descongelação por tubo, usado no instrumento

Prazo de conservação máximo: **24 meses**

Temperatura de armazenamento: **-20 °C**

Outros produtos necessários não fornecidos no kit

- **MyGenius PRO** (EG SpA ref: INT050)
- **Software MyGenius PRO** versão BB-04 (ou posterior)
- **Cartucho de extração** (EG SpA ref: INT052SP)
- **Negative Control** (EG SpA, Ref. CTRNEG)
- **Internal Control Maxi** (EG SpA, Ref. ICMAXI)
- Consumíveis **MyGenius PRO** (ver instruções de utilização do MyGenius PRO)

Protocolo MyGenius PRO

› Volume da amostra › Volume IC › Volume de eluição total	200 µL 10 µL 100 µL	› Volume de entrada de PCR eluato › Q—PCR Mix volume › Frequência dos controlos › Frequência da calibração	20 µL 20 µL 15 dias 60 dias

Desempenhos MyGenius PRO

Matriz	Limite de deteção		Sensibilidade de diagnóstico	Especificidade do diagnóstico	Linearidade (IU/mL)		Fator de conversão (IU / cópias)
	IU/mL	cópias/mL			IU/mL	cópias/mL	
urina	142	89	100%	100%	142→ 16,0 x 10^7	89→ 10,0 x 10^7	1,6
Plasma	215 IU/mL	165 cópias/ /mL	96,2 %	100 %	215→ 13,0 x 10^7	165→ 10,0 x 10^7	1,3

Preparação da amostra

Este produto destina-se a ser usado no **MyGenius PRO** com as seguintes amostras clínicas identificadas de acordo com as diretrizes laboratoriais, e colhidas, transportadas e armazenadas sob as condições seguintes.

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

d, dia.

Procedimentos MyGenius PRO

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

1. Ligue o **MyGenius PRO**. Inicie sessão no modo **STANDBY** com o nome de utilizador e a palavra-passe.	**2.** Carregue todos os consumíveis nas gavetas e esvazie o depósito de resíduos líquidos e as caixas de resíduos sólidos, se necessário. Prima o botão Iniciar para efetuar a Preparação: após a preparação, o instrumento passa para o modo de Funcionamento.	**3.** Verifique os calibradores: **Q-PCR Standard** no menu “Calibration” (Calibração). Verifique os controlos: **Positive Control** e **Negative Control** no menu “Controls” (Controlos). Nota: Todos devem ter sido executados, aprovados e não ter expirado.

4. Descongele os tubos de **PCR Mix** e **IC MAXI**. Submeta a vórtice suave. Centrifugue durante 5 s	**5.** Carregue os tubos de misturas de PCR no carrossel de reagentes seguindo as indicações da GUI.	**6.**Carregue o(s) tubo(s) IC MAXI no suporte azul dedicado e coloque-o(s) na área do Auto Sampler.
7a. Se o instrumento estiver ligado ao LIS, insira as amostras na área do Auto Sampler utilizando suportes dedicados, consoante os diâmetros dos tubos utilizados. A extração inicia-se automaticamente. **7b**. Se o instrumento não estiver ligado ao LIS, na lista de amostras, prima “Assign test” (Atribuir teste), leia o código de barras das amostras com o leitor de códigos de barras externo, selecione Urine matrix (Matriz de urina) e atribua o protocolo de ensaio “BKV ELITe_My_U_IU_200_100” ou “BKV ELITe_My_U_cmL_200_100”, insira as amostras na área do Auto Sampler utilizando suportes dedicados, consoante os diâmetros dos tubos utilizados. A extração inicia-se automaticamente.		

Appendix C BKV ELITe MGB Kit usado em associação com o Instrumento ABI 7500



CAUTION

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

Utilização prevista

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

O ensaio é validado em associação com os instrumentos **ELITe InGenius®** e **ELITe BeGenius®** automatizados e integrados para extração, PCR em tempo real e interpretação de resultados, utilizando amostras humanas de plasma colhido em EDTA, urina colhida sem conservantes e sangue total colhido em EDTA.

O ensaio foi também validado em associação com o instrumento **MyGenius PRO®** (nome de registo ELIVERSE®), sistemas automatizados e integrados para a extração, a PCR em tempo real e a interpretação dos resultados, usando amostras humanas de plasma colhido em EDTA e urina colhida em conservantes.

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

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

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

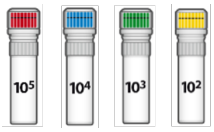
Sequência amplificada

Sequência	Gene	Fluoróforo	Canal
Alvo	Gene do antigénio T grande	FAM	BKV
Controlo Interno	Betaglobina	AP525	IC

Matrizes validadas

- **Plasma** colhido em EDTA

Conteúdo do Kit e produtos relacionados

BKV ELITe MGB Kit	BKV ELITe Standard	BKV- ELITe Positive Control
 X 4	 X 2	 X 2
PCR Mix pronta a utilizar 4 tubos de 540 µL 100 reações por kit 5 ciclos de congelação-descongelação por tubo	Pronta a utilizar, 4 níveis: 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 2 conjuntos de 4 tubos de 200 µL 16 reações por kit 8 ciclos de congelação-descongelação por tubo	Ready-to-use PC 2 tubos de 160 µL 12 reações por kit 8 ciclos de congelação-descongelação por tubo

Prazo de conservação máximo: **24 meses**

Temperatura de armazenamento: **-20 °C**

Outros produtos necessários não fornecidos no kit

- **ELITe GALAXY** INT020
- **ELITe GALAXY 300 extraction kit:** INT021EX
- **ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**
- CPE - Internal Control: CTRCPE
- Água de qualidade para biologia molecular

Desempenhos do 7500 Real-Time PCR Instrument

Matriz	Limite de deteção	Especificidade do diagnóstico	Sensibilidade de diagnóstico	Linearidade (IU/mL),	Fator de conversão IU/mL para cópias/mL	Fator de conversão cópias/mL para IU/mL
Plasma	779 IU/mL	100%	100%	41→ 4,1*10^7	4,1	143,5 x quantidade

Procedimentos 7500 Real-Time PCR Instrument

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

Extração - sistemas validados

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

Amplificação - definições do 7500 Fast Dx

1. Ligue o termociclador
2. Defina o detetor “BKV” para “FAM” e o inativador para “none” (nenhum)
3. Defina o detetor “Internal Control” (Controlo Interno) para “VIC” e o inativador para “none” (nenhum)
4. Defina a fluorescência passiva como “Cy5”

5. Configure o perfil térmico conforme indicado. A aquisição e fluorescência deve ser definida durante o passo de hibridização a 60°C

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

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

Amplificação - Configuração de PCR

Para realizar a configuração da sessão de PCR:

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

Após a configuração da PCR realizada no instrumento:

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

Amplificação - limite para a análise qualitativa

Instrumento	BKV FAM	VIC de controlo interno
7500 Fast Dx Real Time PCR	0,2	0,1

Interpretação

Resultados qualitativos

Valor de Ct do BKV	Valor de Ct do controlo interno	Interpretação
Determinado	–	Positivo
Indeterminado	Ct ≤ 35	Negativo
	Ct >35 ou indeterminado	Inválido

Resultados quantitativos

O valor de CT de BKV obtido para cada amostra e curva de standard gerado é usado para calcular a quantidade de ADN do alvo na reação
A quantificação da amostra vai de cerca de 10 a 10^6 cópias/reação ou cerca de 41 a 4,1 x 10^7 IU/mL

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