

Instructions for use

CRE ELITe MGB® Kit

reagentes para PCR em tempo real do ADN



REF RTS200ING

UDI 08033891486



HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES

Rev.	Aviso de alteração	Data (dd/mm/aa)
05	Extensão de utilização do produto em associação com o instrumento «ELITE BeGenius®» (REF INT040). Atualização do parágrafo “Outros produtos necessários”. Atualização do parágrafo “Nota para o adquirente: licença limitada” Atualização do parágrafo “Símbolos” com o símbolo “Consulte as instruções de utilização” Novos gráficos e definição de conteúdos das instruções de utilização.	24/11/25
04	Alteração da sonda utilizada para a deteção de genes OXA-48-like	14/11/18
03	Correções formais na secção "Amostras e controlos".	30/07/18
02	Utilização alargada do produto com a matriz de hemocultura, em associação com o instrumento ELITE InGenius.	22/12/17
00-01	Desenvolvimento de novo produto e alterações subsequentes	-

NOTE

A revisão destas instruções de utilização também é compatível com as versões anteriores do kit

ÍNDICE

1 UTILIZAÇÃO PREVISTA	4
2 PRINCÍPIOS DO ENSAIO.....	4
3 DESCRIÇÃO DO PRODUTO	4
4 MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO.....	5
5 MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO	5
6 OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS	5
7 AVISOS E PRECAUÇÕES	6
8 AMOSTRAS E CONTROLOS	7
9 PROCEDIMENTO do ELITe InGenius	9
10 PROCEDIMENTO do ELITe BeGenius	14
11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	18
12 REFERÊNCIAS	28
13 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	28
14 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	29
15 SÍMBOLOS.....	31
16 NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	31
Appendix A QUICK START GUIDE.....	33

1 UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto **CRE ELITE MGB® Kit** consiste num dispositivo médico de diagnóstico in vitro destinado a ser utilizado pelos profissionais de saúde como um ensaio qualitativo de PCR em tempo real de ácidos nucleicos para a detecção de ADN de genes de resistência à carbapenema* (KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48-like) de *Enterobacteriaceae*.

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 esfregaços retais e hemocultura.

O produto está previsto para utilização como auxiliar no diagnóstico e rastreio de infeções por *Enterobacteriaceae* positivas para genes de resistência à carbapenema, em associação com os dados clínicos do paciente e outros resultados de testes laboratoriais.

O produto é também compatível com a caracterização de *Enterobacteriaceae* positivas para genes de resistência à carbapenema em amostras de ADN extraídas de isolado de cultura.

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

*Para a lista completa das variantes genéticas detetadas por este produto, consulte [11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO page 18](#)

2 PRINCÍPIOS DO ENSAIO

O ensaio é uma detecção qualitativa de PCR em tempo real do ADN dos genes de resistência à carbapenema **KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48-like** de *Enterobacteriaceae* isolado de amostras e amplificado usando o reagente de ensaio CRE PCR Mix, que contém primers e sondas com tecnologia ELITE MGB Kit.

As sondas ELITE MGB Kit são ativadas quando hibridizam com os correspondentes produtos da PCR. **ELITE InGenius** e o **ELITE BeGenius** monitoriza o aumento da fluorescência e calcula o ciclo de limiar (Ct).

Nas sondas ELITE MGB Kit, 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.

NOTE

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

- família de genes **KPC**, detetado no Canal **KPC**; a sonda é estabilizada por MGB, inativada pelo Eclipse Dark Quencher® e identificada pelo corante FAM,
- família de genes **NDM** detetada no Canal **NDM VIM IMP**; as sondas são estabilizadas por MGB, inativadas pelo Eclipse Dark Quencher® e identificadas pelo corante AquaPhluor 593 (AP593),
- família de genes **VIM** detetada no Canal **NDM VIM IMP**; as sondas são estabilizadas por MGB, inativadas pelo Eclipse Dark Quencher® e identificadas pelo corante AquaPhluor 593 (AP593),
- família de genes **IMP** detetada no Canal **NDM VIM IMP**; as sondas são estabilizadas por MGB, inativadas pelo Eclipse Dark Quencher® e identificadas pelo corante AquaPhluor 593 (AP593),
- família de genes **OXA-48-like** detetada no Canal **OXA**; as sondas são estabilizadas por MGB, inativadas pelo Eclipse Dark Quencher® e identificadas pelo corante AquaPhluor 639 (AP639),
- Internal Control (**IC**), específico para a sequência artificial IC2, detetado no Canal **IC**; a sonda é estabilizada por MGB, inativado pelo Eclipse Dark Quencher e identificado pelo corante AquaPhluor 525 (AP525).

A **CRE PCR Mix** também contém o tampão, o cloreto de magnésio, os trifosfatos nucleotídicos, os estabilizadores e a enzima de polimerase de ADN Taq com ativação térmica (início a quente).

NOTE

Os três genes da família metal beta-lactamase, NDM, VIM e IMP, são detetados por diferentes sondas com o mesmo corante fluorescente e, depois, detetados pelo mesmo Canal NDM VIM IMP e não podem ser distinguidos.

O **CRE ELITE MGB Kit** contém reagentes suficientes para **96 testes** no **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius (12 testes em cada tubo)**, com 20 µL usados por reação.

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

4 MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Table 1

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
CRE PCR Mix ref. RTS200ING	Mistura de reagentes para PCR em tempo real tubo com tampa NATURAL	8 x 280 µL	-

5 MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- Exaustor de fluxo de ar laminar.
- Luvas de nitrilo sem pó descartáveis ou material semelhante.
- Misturador de vórtice.
- Microcentrífuga de bancada (~5.000 RPM).
- Microcentrífuga de bancada (~13.000 RPM).
- Micropipetas e pontas esterilizadas com filtro de aerossóis ou pontas esterilizadas de deslocação positiva (intervalo de volume: 0,5 - 1000 µL).
- Tubo de 50 mL com tampa roscada (Sarstedt, Alemanha, ref. 62.547.254).
- Tubo de 15 mL com tampa roscada (Sarstedt, Alemanha, ref. 62.554.502).
- Tubo com base de sustentação de 2,0 mL com tampa roscada (Sarstedt, ref. 72.694.005).
- Água de qualidade para biologia molecular.

6 OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

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

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

Table 2

Instrumentos e software	Produtos e reagentes
ELiTe InGenius (ELiTechGroup S.p.A., EG SpA ref. INT030) Software ELiTe InGenius versão 1.3.0.19 (ou mais recente) CRE ELiTe_PC , protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Positive Control CRE ELiTe_NC , protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Negative Control CRE ELiTe_RcS_200_100 , protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostras de esfregaços nasais CRE ELiTe_BC_200_100 , protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostras de hemocultura	CRE — ELiTe Positive Control (EG SpA, ref. CTR200ING) ELiTe InGenius SP200 (EG SpA, ref. INT032SP200) Consumíveis ELiTe InGenius e ELiTe BeGenius (ver instruções de utilização do ELiTe InGenius e do ELiTe BeGenius) CPE – Internal Control (EG SpA, ref. CTRCPE) eNAT™ kit (Copan, ref. 608CS01R), FecalSwab™ (COPAN Italia S.p.A., ref. 470CE),
ELiTe BeGenius (EG SpA ref. INT040) Software ELiTe BeGenius versão 2.3.0. (ou superior) CRE ELiTe_Be_PC , protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Positive Control CRE ELiTe_Be_NC , protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Negative Control CRE ELiTe_Be_RcS_200_100 , protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostras de esfregaços nasais CRE ELiTe_Be_BC_200_100 , protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostras de hemocultura	

7 AVISOS E PRECAUÇÕES

Este produto foi concebido para utilização exclusiva in-vitro.

7.1 Avisos e precauções gerais

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

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

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

Nunca deve pipetar soluções com a boca.

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

Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.

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

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

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

Não utilize o produto após a data de validade indicada.

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

Não use reagentes de lotes diferentes.

Não use reagentes de outros fabricantes.

7.2 Avisos e precauções para biologia molecular

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

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, 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)
CRE PCR Mix	-20°C ou inferior (protegido da luz)	um mês	até quatro	até quatro sessões separadas* de três horas cada

*com congelamento intermédio

8 AMOSTRAS E CONTROLOS

8.1 Amostras e protocolos de ensaio

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

Table 4

Amostra	Requisitos de colheita	Condições de transporte/armazenamento			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2° / +8°C	-20 ±10 °C	-70 ±15 °C
hemocultura	—	≤ 24 horas	—	—	—
esfregaço retal	colhido com eNAT™ kit	—	≤ 1 mês	≤ 6 meses	Períodos longos
esfregaço retal	colhido em FecalSwab™ kit	—	≤ 3 dias	—	—

Antes da análise, dilua a hemocultura numa relação de 1:1000 em água ultrapurificada (pelo menos 10 µL de amostras em 10 mL de água ultrapurificada), misture por meio de vórtice e transfira 0,2 mL de amostras diluídas para um tubo de extração (para o instrumento ELITE InGenius) ou para um tubo Sarstedt de 2 mL (para o instrumento ELITE BeGenius).

Antes da análise do esfregaço retal colhido em FecalSwab™, deve transferir 0,5 mL de amostra em meio FecalSwab™ para um tubo eNAT™ limpo com 2,0 mL de meio, agitado em vórtice. Após a adição de 0,5 mL de amostra ao meio FecalSwab™, o tubo eNAT™ pode ser colocado diretamente no sistema como um tubo primário. As amostras diluídas no meio eNAT™ podem ser armazenadas nas mesmas condições indicadas na tabela acima.

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.

Este produto é compatível para utilização com isolados de cultura e ELITE InGenius: antes da análise com este produto, dilua a amostra num tubo de eNAT™ fresco com 2,0 mL de meio, tirando com um laço uma alíquota de colônia isolada, submeta a vórtice e transfira 0,2 mL de amostra diluída para o tubo de extração. Quando a extração de ácido nucleico de isolados de cultura é realizada com o ELITE InGenius, utilize o protocolo de extração **CRE ELITE_BC_200_100**.

Para realizar o teste das amostras no **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**, devem ser usados os seguintes protocolos de ensaio. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os kits ELITE MGB Kit e o **ELITE InGenius** ou o **ELITE BeGenius** com as matrizes indicadas.

Table 5 Protocolos de ensaio para o CRE ELITE MGB Kit

Protocolos de ensaio para o BRE ELITE MGB Kit				
Amostra	Instrumento	Nome do protocolo de ensaio	Relatório	Características
esfregaço retal	ELITE InGenius	CRE ELITE_RcS_200_100	Positiva / Negativa	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Fator de diluição: 1
	ELITE BeGenius	CRE ELITE_Be_RcS_200_100	Positiva / Negativa	Volume da PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
hemocultu- ra	ELITE InGenius	CRE ELITE_BC_200_100	Positiva / Negativa	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Fator de diluição: 1
	ELITE BeGenius	CRE ELITE_Be_BC_200_100	Positiva / Negativa	Volume da PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

NOTE

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

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

Consulte "Substâncias Potencialmente Interferentes" na secção [11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO page 18](#) para verificar os dados relativos a substâncias interferentes.

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

8.2 Controlos da PCR

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

NOTE

O **ELiTe InGenius** e **ELiTe BeGenius** permite a geração e o armazenamento e a validação do controlo de PCR para cada lote de reagente de PCR. Os resultados do controlo da PCR expiram após **15 dias** e, nesse momento, é necessário voltar a executar o Positive Control e o Negative Control. Os controlos da PCR devem ser executados novamente se ocorrer algum dos seguintes eventos:

- se for usado um novo lote de reagentes,
- os resultados da análise de controlo da qualidade se encontrarem fora da especificação (ver o parágrafo seguinte),
- for realizada qualquer reparação ou manutenção significativa no **ELiTe InGenius** ou **ELiTe BeGenius**.

8.3 Controlos da qualidade

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

9 PROCEDIMENTO do ELiTe InGenius

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

Table 6

PASSO 1	Verificação da prontidão do sistema	
PASSO 2	Preparação da sessão	A) Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR])
		B) Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])
		C) Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [apenas PCR])
PASSO 3	Revisão e aprovação de resultados	1) Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control
		2) Validação dos resultados das amostras
		3) 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 “Controlos” na página inicial, verifique se os controlos de PCR (**Positive Control**, **Negative Control**) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de **PCR Mix** a ser utilizado. Caso não haja controlos de PCR válidos disponíveis para o lote da **PCR Mix** execute os controlos de PCR conforme descrito nas secções seguintes,
- escolher o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela EG SpA. (ver “Amostras e Controlos”)

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

9.2 PASSO 2 - Configuração da sessão

OCRE 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 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 **12 testes** em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

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

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

Table 7

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])	C. Execução do Positive e Negative Control (PCR Only [apenas PCR])
1	Identifique amostras e, se necessário, descongele até à temperatura ambiente. Se necessário, transfira 200 µL da amostra para um tubo de extração anteriormente identificado.	Descongele os Elution tubes 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.	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. Cada tubo é suficiente para 4 reações.
2	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.	Não aplicável	Prepare o Negative Control transferindo pelo menos 50 µL de água de grau de biologia molecular para um “Elution tube” (Tubo de eluição), fornecido com o ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
3	Selecione “Perform Run” (Executar) a partir do ecrã “Home”.	Selecione “Perform Run” (Executar) a partir do ecrã “Home”.	Selecione “Perform Run” (Executar) a partir do ecrã “Home”.
4	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.	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.

Table 7 (continued)

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])	C. Execução do Positivo e Negative Control (PCR Only [apenas PCR])
5	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.	Não aplicável
6	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")	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.
7	Certifique-se de que o "Protocol" (Protocolo) apresentado é: "Extract + PCR" (Extrair + PCR).	Selecione "PCR Only" (apenas PCR) na coluna "Protocol".	Certifique-se de que "PCR Only" (Apenas PCR) está selecionado na coluna "Protocol" (Protocolo).
8	Selecione a posição de carregamento da amostra como "Extraction Tube" (Tubo de extração) ou "Primary tube" (Tubo primário) na coluna "Sample Position" (Posição da amostra).	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]).
9	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
10	Carregue a CPE e PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) consultando a "Load List" (Lista de carregamentos) e introduza a CPE e o número de lote, data de validade e o número de reações da PCR Mix para cada tubo.	Carregue a PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) consultando a "Load List" (Lista de carregamentos) e introduza o número de lote, data de validade e o número de reações da PCR Mix para cada tubo.	Carregue a PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) consultando a "Load List" (Lista de carregamentos) e introduza o número de lote, data de validade e o número de reações da PCR Mix para cada tubo.
11	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
12	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.	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.
13	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
14	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 os tubos de eluição com as amostras extraídas	Carregue os tubos de PCR Cassette, Positive Control e Negative Control.
15	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
16	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
17	Prima "Start" (Iniciar).	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 4 sessões separadas de 3 horas cada; misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a próxima sessão.

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 Internal Control 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 os resultados, imprimir ou guardar os relatórios (“Sample Report” ou “Track Report”). 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 **CRE ELiTe MGB Kit** através do seguinte procedimento:

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

9.4 Validação da amplificação dos resultados de Positive Control e Negative Control

O **ELiTe InGenius Software** interpreta os resultados da PCR para os alvos da reação de Positive Control e Negative Control com os parâmetros dos protocolos de ensaio **ELiTe_PC** e **ELiTe_NC**. Os valores de Ct resultantes são usados para verificar o sistema (lote de reagentes e instrumento).

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

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

Os resultados da amplificação do Positive Control e Negative Control são usados pelo **software ELiTe InGenius** para preparar os Gráficos de controlo que monitorizam os desempenhos do passo de amplificação. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

NOTE

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

NOTE

Se o resultado de Positive Control ou Negative Control não for válido e as amostras tiverem sido incluídas na mesma execução, as amostras podem ser aprovadas mas os resultados não são válidos. Neste caso, o controlo(s) falhado e as amostras têm de ser todos repetidos.

9.5 Validação dos resultados da amostra

O **ELiTe InGenius software** interpreta os resultados de PCR para o alvo (canais **KPC, NDM, VIM, IMP, OXA**) e do Internal Control (canal **IC**) com os parâmetros dos protocolos de ensaio **CRE ELiTe_RcS_200_100** e **CRE ELiTe_BC_200_100**.

Os resultados são mostrados no ecrã “Result Display”.

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

Table 8

1) Positive Control	Estado
CRE Positive Control	APROVADO
2) Negative Control	Estado
CRE - Negative Control	APROVADO

Os resultados da amostra são automaticamente interpretados pelo **software ELiTe InGenius** usando os parâmetros do Assay Protocol (Protocolo do ensaio). Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado.

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

Table 9

Resultado da execução da amostra	Interpretação
KPC:DNA detected (KPC:DNA detetado)	Foi detetado ADN do gene KPC na amostra.
NDM VIM IMP:DNA detected (NDM VIM IMP:DNA detetado)	Foi detetado ADN do gene NDM, VIM ou IMP na amostra.
OXA:DNA detected (OXA:DNA detetado)	Foi detetado ADN do gene OXA na amostra.
KPC:DNA Not detected or below the LoD (KPC:DNA não detetado ou abaixo de LoD)	Não foi detetado ADN do gene KPC na amostra. A amostra é negativa válida para este gene ou a sua concentração está abaixo do Limite de deteção do ensaio.
NDM VIM IMP:DNA Not detected or below the LoD (NDM VIM IMP:DNA não detetado ou abaixo de LoD)	Não foi detetado ADN do gene NDM, VIM e IMP na amostra. A amostra é negativa válida para estes genes ou as respetivas concentrações estão abaixo do Limite de deteção do ensaio.

Table 9 (continued)

Resultado da execução da amostra	Interpretação
OXA:DNA Not detected or below the LoD (OXA:DNA não detetado ou abaixo de LoD)	Não foi detetado ADN do gene OXA na amostra. A amostra é negativa válida para este gene ou a sua concentração está abaixo do Limite de deteção do ensaio.
Invalid-Retest Sample (Inválido-Testar novamente a amostra).	Resultado da amostra não válido devido a falha do Internal Control (Extração incorreta ou transferência do inibidor). O teste deve ser repetido.

Amostras indicadas como “Invalid-Retest Sample” (Inválido-Testar novamente a amostra): neste caso, o ADN do Internal Control não foi detetado eficientemente devido a problemas nos passos de colheita, extração ou PCR da amostra (por ex. amostragem incorreta, degradação ou perda do ADN durante a extração ou inibidores na eluição), que pode causar resultados incorretos. Se subsistir volume da eluição suficiente, o eluato pode ser novamente testado 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 “[14 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS page 29](#)”).

Amostras reportadas como: “xxx:DNA Not detected or below the LoD” (xxx:DNA não detetado ou abaixo de LoD) são adequadas para análise mas não foi possível detetar o ADN alvo. Neste caso não pode excluir-se que o ADN alvo esteja presente a uma concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver “[11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO page 18](#)”).

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).

9.6 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 CRE ELiTe MGB Kit com o ELiTe BeGenius é composto por três passos:

Table 10

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

Table 10 (continued)

PASSO 3	Revisão e aprovação de resultados	1) Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control
		2) Validação dos resultados das amostras
		3) 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 “Controlos” na página inicial, verifique se os controlos de PCR (**Positive Control, Negative Control**) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de **PCR Mix** a ser utilizado. Caso não haja controlos de PCR válidos disponíveis para o lote da **PCR Mix**, execute os controlos de PCR conforme descrito nas secções seguintes,
- escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela EG SpA (consulte “Amostras e Controlos”).

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

10.2 PASSO 2 - Configuração da sessão

OCRE **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 do Positive Control e Negative Control (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 12 testes em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

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

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

Table 11

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])	C. Execução do Positive e Negative Control (PCR Only [apenas PCR])
1	Identifique amostras e, se necessário, descongele até à temperatura ambiente. Se necessário, transfira 200 µL da amostra para um tubo Sarstedt de 2 mL anteriormente identificado.	Se necessário, descongele os tubos 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.	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. Cada tubo é suficiente para 4 reações.
2	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.	Não aplicável	Prepare o Negative Control transferindo pelo menos 50 µL de água de grau de biologia molecular para um "Elution tube" (Tubo de eluição), fornecido com o ELiTe InGenius SP 200 Consumable Set.
3	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home".	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home"	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home".
4	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	Retire os "Racks" de "Lane 1, 2 and 3" (L1, L2, L3) da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
5	Selecione o "Run mode": "Extract + PCR" (Extrair + PCR).	Selecione o "Run mode": "PCR Only" .	Selecione o "Run mode": "PCR Only" .
6	Carregue as amostras no "Sample Rack" (Suporte de amostras). Quando os tubos secundários "2 mL Tubes" forem carregados, use adaptadores azuis para o "Sample Rack" (Rack da amostra).	Carregue as amostras no "Elution Rack" (Rack de eluição).	Carregue os tubos de Positive Control e Negative Control no "Elution Rack".
7	Insira o "Sample Rack" na "Cooler Unit" começando a partir da "Lane 5" (L5). Se necessário, insira a "Sample ID" (SID) para cada "Position" usada (se os tubos secundários estiverem carregados, sinalize o "2 mL Tube". Se os tubos secundários não possuírem código de barras, digite manualmente a "Sample ID").	Insira o "Elution Rack" 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).	Insira o "Elution Rack" na "Cooler Unit" começando a partir da "Lane 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).
8	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
9	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume de entrada de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição extraído") é de 100 µL	Não aplicável	Não aplicável
10	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").	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").
11	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.

Table 11 (continued)

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])	C. Execução do Positive e Negative Control (PCR Only [apenas PCR])
	Nota: Quando forem processadas mais de 12 amostras, repita o procedimento a partir do ponto 6.		Não aplicável
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	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	Não aplicável
14	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Não aplicável	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).	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 reagente da 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 reagente da 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" na "Cooler Unit" na "Lane 2" (L2) se estiver disponível, ou na "Lane 1" (L1). Se necessário, para cada reagente da 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.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
18	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.	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.
19	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
20	Carregue o "PCR Rack" com a "PCR Cassette" na área dos reagentes.	Carregue o "PCR Rack" com a "PCR Cassette" na área dos reagentes.	Carregue o "PCR Rack" com a "PCR Cassette" na área dos reagentes.
21	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
22	Carregue o "Extraction Rack" (rack de extração) com os cartuchos de extração "ELITE InGenius SP 200" e os consumíveis de extração necessários.	Não aplicável	Não aplicável
23	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
24	Prima "Start" (Iniciar).	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 4 sessões separadas de 3 horas cada; misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a próxima sessão.

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 Internal Control 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 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 **CRE ELITe MGB Kit** através do seguinte procedimento:

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

NOTE

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

11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Como se demonstrou que o **ELITe BeGenius** tem um desempenho analítico equivalente ao do **ELITe InGenius**, os resultados apresentados nas secções seguintes são também considerados aplicáveis ao **ELITe BeGenius**.

11.1 Sensibilidade analítica: Limite de detecção

A sensibilidade analítica, como limite de detecção (LdD) do ensaio, foi determinada no **ELITE InGenius** testando 6 estirpes de CRE, uma de cada um dos seguintes tipos de genes: KPC, IMP, VIM, NDM, OXA-48 e OXA-181 em associação com amostras de esfregaços retais.

O LdD para cada uma das estirpes de CRE foi estimada por análise de regressão probit dos dados com a concentração a corresponder a 95% de probabilidade de um resultado positivo.

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Table 12 Limite de detecção (CFU/mL) para amostras de esfregaços retais e ELITE InGenius

Alvo	Isolado bacteriano	LdD (CFU / mL)	Intervalo de confiança de 95% (CFU / mL)	
			Limite inferior	Limite superior
KPC	<i>C. freundii</i> , UCLA 14-13-A2	99	69	217
NDM	<i>E. coli</i> , ATCC BAA-2469	144	110	228
VIM	<i>K. pneumoniae</i> , NCTC 13439	399	338	579
IMP	<i>E. coli</i> , NCTC 13476	273	234	351
OXA-48	<i>E. coli</i> , ATCC BAA-2523	300	241	456
OXA-181	<i>K. pneumoniae</i> , JMI 18	179	139	287

O LdD calculado foi verificado nos instrumentos em amostras de esfregaço retal no ELITE InGenius através do teste de amostras de esfregaço retal reforçadas com material de referência de cada alvo na concentração indicada.

Os resultados obtidos confirmaram a alegada concentração para todos os alvos do CRE ELITE MGB Kit com as mostras de esfregaço retal no ELITE InGenius.

11.2 Eficiência da detecção (inclusividade)

A eficiência de detecção em diferentes variantes de genes de resistência à carbapenema foi avaliada por comparação *in silico* das sequências de sonda e primer do ensaio com as sequências disponíveis na base de dados de nucleótidos NCBI.

A análise demonstrou a conservação da sequência e a ausência de mutações significativas para as variantes indicadas na tabela a seguir.

Table 13

alvo	Variantes cuja detecção é esperada pelo produto CRE ELITE MGB® Kit
KPC	KPC-01, KPC-02, KPC-03, KPC-04, KPC-05, KPC-06, KPC-07, KPC-08, KPC-09, KPC-10, KPC-11, KPC-12, KPC-13, KPC-14, KPC-15, KPC-16, KPC-17, KPC-18, KPC-19, KPC-21, KPC-22, KPC-25, KPC-33, KPC-47e, KPC-56a, KPC-63d, KPC-272, KPC-484, KPC-629, KPC-727, KPC-860.
NDM	NDM-01, NDM-02, NDM-03, NDM-04, NDM-05, NDM-06, NDM-07, NDM-08, NDM-09, NDM-10, NDM-12, NDM-13, NDM-15, NDM-16, NDM-17, NDM-32, NDM-40, NDM-221, NDM-255, NDM-264, NDM-265
VIM	VIM-01, VIM-02, VIM-03, VIM-04, VIM-05, VIM-06, VIM-07, VIM-08, VIM-09, VIM-10, VIM-11, VIM-12, VIM-13, VIM-14, VIM-15, VIM-16, VIM-17, VIM-18, VIM-19, VIM-20, VIM-23, VIM-24, VIM-25, VIM-26, VIM-27, VIM-28, VIM-31, VIM-33, VIM-34, VIM-35, VIM-36, VIM-37, VIM-38, VIM-39, VIM-40, VIM-42, VIM-43, VIM-44, VIM-45, VIM-46, VIM-47, VIM-49, VIM-50, VIM-51

Table 13 (continued)

alvo	Variantes cuja detecção é esperada pelo produto CRE ELITE MGB® Kit
IMP	IMP-01, IMP-02, IMP-03, IMP-04, IMP-05, IMP-06, IMP-07, IMP-08, IMP-09, IMP-10, IMP-11, IMP-13, IMP-14, IMP-15, IMP-16, IMP-18, IMP-19, IMP-20, IMP-21, IMP-22, IMP-24, IMP-25, IMP-26, IMP-28, IMP-29, IMP-32, IMP-33, IMP-34, IMP-37, IMP-38, IMP-40, IMP-41, IMP-42, IMP-45, IMP-48, IMP-49, IMP-51, IMP-54, IMP-56, IMP-58
OXA	OXA-48, OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-199, OXA-204, OXA-232, OXA-244, OXA-245, OXA-370, OXA-405, OXA-416, OXA-439, OXA-484

A eficiência de detecção de diferentes variantes de genes de resistência à carbapenema também foi verificada para um conjunto de 18 isolados de CRE bem caracterizados. Amostras artificiais foram preparadas através do reforço de isolados de teste numa matriz retal negativa a concentrações próximas do LdD. Foram testados dois a três isolados de cada tipo de gene KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48-like.

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Table 14 Eficiência de detecção (inclusividade) do produto CRE ELITE MGB Kit

Organismo	Isolado	Marcador CRE	Concentração(CFU/ /mL)	Resultado
<i>K. pneumoniae</i>	CDC-ARIB-0034	IMP	798	Inclusivo
<i>P. aeruginosa</i>	CDC-ARIB-0103	IMP-1	762	Inclusivo
<i>P. aeruginosa</i>	CDC-ARIB-0092	IMP-14	762	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	NCTC 13438	KPC	297	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	BAA-1898	KPC-2	297	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	BAA-1904	KPC-3	347	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	BAA-2146	NDM1	294	Inclusivo
<i>E. coli</i>	CDC-ARIB-0150	NDM-5	294	Inclusivo
<i>E. coli</i>	CDC-ARIB-0137	NDM-6	294	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	ST-14 (também denominado R20)	OXA-181	537	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	CDC-ARIB-0140	OXA-181	537	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	CDC-ARIB-0066	OXA-232	900	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	CDC-ARIB-0075	OXA-232	900	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	BAA-2524	OXA-48	900	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	CDC-ARIB-0160	OXA-48	900	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	NCTC 13440	VIM-1	843	Inclusivo
<i>P. aeruginosa</i>	NCTC 13437	VIM-10	843	Inclusivo
<i>P. aeruginosa</i>	CDC-ARIB-0054	VIM-4	843	Inclusivo

Todos os isolados de CRE testados foram detetados e considerados inclusivos pelo CRE ELITE MGB Kit a concentrações de cerca de 300 - 900 CFU / mL.

A eficiência de detecção de diferentes variantes de genes de resistência à carbapenema também foi verificada para um conjunto de 114 isolados de cultura de CRE caracterizados. Cada amostra foi diluída no eNAT™ kit e depois testada com CRE ELITE MGB Kit e ELITE InGenius no modo Extração + PCR. Os isolados de cultura foram representativos dos diferentes gêneros de Enterobacteriaceae (por ex., *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*, *C. koseri*).

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 15 Eficiência de detecção (inclusividade) do produto CRE ELITE MGB Kit

Amostras	N	Positivo	Negativo	Inválido
Isolados de cultura positivos para KPC	22	22	0	0
Isolados de cultura positivos para OXA-48	35	35	0	0
Isolados de cultura positivos para NDM	23	23	0	0
Isolados de cultura positivos para IMP	11	11	0	0
Isolados de cultura positivos para VIM 17 0 0	17	17	0	0
Isolados de cultura positivos para OXA-48 e NDM	6	6	0	0

Todos os isolados de CRE testados foram detetados e considerados inclusivos pelo CRE ELITE MGB Kit.

11.3 Marcadores potencialmente interferentes

A reatividade cruzada potencial do ensaio com outros alvos não pretendidos foi primeiro avaliada através da análise *in silico* de sequências disponíveis na bases de dados de nucleótidos NCBI.

Um alinhamento das sequências de primer e sonda com as sequências disponíveis na base de dados, incluindo os organismos que se poderia razoavelmente esperar que estivessem presentes nas amostras clínicas, tais como flora comum de organismos oportunistas retais, vírus, células, parasitas intestinais e organismos produtores de beta-lactamase estreitamente relacionados demonstrou a ausência de homologias significativas e não indicou uma interferência potencial.

A ausência de reatividade cruzada com outros organismos estreitamente relacionados (resistência relacionada) também foi verificada através do teste das amostras de isolados indicadas na tabela abaixo à concentração de 10^6 CFU / mL em triplicado.

Table 16 Marcadores potencialmente interferentes do produto CRE ELITE MGB Kit

Organismo	Isolado	Marcador de resistência a antibiótico	Concentração (CFU/ mL)	Resultado
<i>K. pneumoniae</i>	700603	SHV	10^6	Sem reatividade cruzada
<i>E. coli</i>	BAA-202	SHV	10^6	Sem reatividade cruzada
<i>E. coli</i>	BAA-201	TEM	10^6	Sem reatividade cruzada
<i>S. marcescens</i>	14-13-A11	SME	10^6	Sem reatividade cruzada
<i>S. marcescens</i>	14-13-A12	SME	10^6	Sem reatividade cruzada
<i>A. baumannii</i>	13301	OXA-23	10^6	Sem reatividade cruzada

Table 16 Marcadores potencialmente interferentes do produto CRE ELITE MGB Kit (continued)

Organismo	Isolado	Marcador de resistência a antibiótico	Concentração (CFU/mL)	Resultado
<i>A. baumannii</i>	13302	OXA-25	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>A. baumannii</i>	13303	OXA-26	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>A. baumannii</i>	13304	OXA-27	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>A. baumannii</i>	13305	OXA-58	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>A. baumannii</i>	13420	Clone SE de OXA-51-like	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>K. pneumoniae</i>	DICON-185	CTX-M-1	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>E. coli</i>	DICON-003	CTX-M-1	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>E. coli</i>	DICON-178	CTX-M-9	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>K. pneumoniae</i>	DICON-005	CTX-M-9	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>E. cloacae</i>	NCTC 13464	CTX-M-9	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>E. coli</i>	13353	CTX-M-15	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>K. pneumoniae</i>	CDC-ARIB-0044	CTX-M-15	10 ⁶	Sem reatividade cruzada

Todos à exceção dos isolados de DICON185 de *K. pneumoniae* foram determinados como sendo negativos em 3 de 3 réplicas quando testados com o CRE ELITE MGB Kit. O isolado de DICON185 de *K. pneumoniae* apresentou sinal positivo em uma de 3 réplicas. Quando retestado com 5 réplicas, o isolado apresentou 5 de 5 negativos e foi considerado como sem reação cruzada.

11.4 Substâncias interferentes

Substâncias potencialmente interferentes às mais altas concentrações clinicamente relevantes foram individualmente reforçadas nos isolados de CRE contendo matriz retal negativa ao nível de concentração de cerca de 3 vezes o LdD. As substâncias testadas foram: enemas (óleo de vaselina), lubrificante espermicida (Nonoxynol-9), medicamentos anti-diarreicos (subsalicilato de bismuto), laxantes (Senósido), antibiótico (Vancomicina), antiácidos (ácido alginico / hidróxido de alumínio / trissilicato de magnésio, carbonato de cálcio, cimetidina, omeprazol), componentes fecais (ácido palmítico, ácido esteárico, mucina, ADN genômico humano, leucócitos humanos, sangue total humano). Um isolado de cada tipo de gene KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48 e OXA-181 foi testado em triplicado com o CRE ELITE MGB Kit e o sistema ELITE InGenius.

Verificou-se que nenhuma das substâncias testada interferiu com o CRE ELITE MGB® Kit.

A possível interferência durante a reação de amplificação de 2-propanol, usado no processo de extração, foi avaliada testando ADN extraído da matriz retal negativa contendo isolados de CRE a um nível de concentração de cerca de 400 CFU/mL. Um isolado de cada tipo de gene KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48 e OXA-181 foi testado em triplicado com o CRE ELITE MGB Kit e o sistema ELITE InGenius.

O teste demonstrou que até à concentração de 2 propanol a 10%, o produto CRE ELITE MGB Kit não apresenta nenhum resultado falso negativo.

11.5 Ausência de contaminação cruzada

A ausência de contaminação cruzada de amostras positivas a negativas ou a transferência entre execuções foi verificada pela realização de 3 execuções integradas (extração de ADN do tubo primário seguida de PCR) com 6 amostras positivas para KPC altas a 10^6 CFU / mL em meio eNAT alternadas com 6 amostras negativas de meio eNAT.

Determinou-se não ter havido contaminação cruzada entre calhas ou a transferência entre execuções após o teste de 18 amostras negativas e 18 amostras negativas numa configuração em xadrez com o sistema ELITE InGenius™.

11.6 Falha de todo o sistema

A taxa de falha geral do sistema, que origina resultados falsos negativos, foi verificada analisando 50 amostras reforçadas com IMP preparadas a partir de isolados na matriz retal negativa e foi equivalente a 0%.

As 50 amostras de matriz retal negativa foram reforçadas com um isolado de IMP a uma concentração final de cerca de 400 CFU/mL. Cada amostra do painel foi testada através da realização de todo o procedimento de análise a começar pelo tubo primário com o sistema ELITE InGenius™.

Todas as amostras testadas apresentaram um resultado positivo com o CRE ELITE MGB Kit.

11.7 Repetibilidade

A repetibilidade do ensaio foi testada no **ELITE InGenius** através da análise de um painel de amostras de esfregaço retal, incluindo uma amostra negativa e três amostras positivas (estirpes CKPC + NDM + OXA, VIM e IMP CRE) a concentração baixa e moderada.

É apresentado a seguir um resumo dos resultados da repetibilidade no ELITE InGenius.

Table 17 Repetibilidade no ELITE InGenius

Alvo	Tipo de amostra	Ct média	SD	%CV
KPC	Positivo baixo	34,82	0,48	1,4%
	Positivo moderado	33,84	0,49	1,4%
NDM	Positivo baixo	36,87	0,51	1,4%
	Positivo moderado	35,21	0,24	0,7%
OXA	Positivo baixo	34,80	0,32	0,9%
	Positivo moderado	33,17	0,32	1,0%
VIM	Positivo baixo	35,26	0,19	0,5%
	Positivo moderado	33,47	0,20	0,6%
IMP	Positivo baixo	35,72	0,73	2,0%
	Positivo moderado	33,90	0,43	1,3%
IC	n.a.	29,56	0,43	1,5%
	n.a.	29,81	0,61	2,0%

A repetibilidade do ensaio foi verificada no instrumento **ELITE BeGenius** através da análise de um painel de amostras de esfregaço retal, incluindo uma amostra negativa e quatro amostras positivas reforçadas com materiais de referência de cada estirpe a baixa concentração.

Um exemplo de resultados de repetibilidade no ELITE BeGenius é mostrado na tabela seguinte.

Table 18 Repetibilidade intra-sessão no ELiTe BeGenius

Amostra	N	NDM VIM IMP			KPC			OXA			% Con- cordân- cia
		Ct médio	DP de Ct	%CV	Ct médio	DP de Ct	%CV	Ct médio	DP de Ct	%CV	
Negativo	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100%
NDM + OXA-48	6	33,85	0,15	0,44	-	-	-	33,33	0,45	1,35	100%
VIM + KPC	6	30,91	0,21	0,67	30,02	0,31	1,03	-	-	-	100%
IMP + OXA-181	6	32,38	0,23	0,72	-	-	-	34,45	0,24	0,70	100%

Table 19 Repetibilidade inter-sessão no ELiTe BeGenius

Amostra	N	NDM VIM IMP			KPC			OXA			% Con- cordân- cia
		Ct médio	DP de Ct	%CV	Ct médio	DP de Ct	%CV	Ct médio	DP de Ct	%CV	
Negativo	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100%
NDM + OXA-48	12	34,01	0,31	0,92	-	-	-	33,33	0,38	1,13	100%
VIM + KPC	12	31,06	0,48	1,53	30,52	0,60	1,96	-	-	-	100%
IMP + OXA-181	12	32,94	0,68	2,05	-	-	-	34,52	0,44	1,28	100%

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

11.8 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do ensaio foi testada no **ELiTe InGenius** através da análise de um painel de amostras de esfregaço retal, incluindo uma amostra negativa e três amostras positivas (estirpes CKPC + NDM + OXA, VIM e IMP CRE) a concentração baixa e moderada.

É apresentado a seguir um resumo dos resultados da reprodutibilidade no ELiTe InGenius.

Table 20 Reprodutibilidade no ELiTe InGenius

Alvo	Tipo de amostra	Ct média	Entre instrumentos		Entre lotes	
			SD	% CV	SD	% CV
KPC	Positivo baixo	35,00	0,289	0,83%	0,214	0,61%
	Positivo moderado	34,53	0,428	1,24%	0,312	0,90%
NDM	Positivo baixo	36,44	0,223	0,61%	0,000	0,00%
	Positivo moderado	35,32	0,317	0,90%	0,000	0,00%
OXA	Positivo baixo	33,65	0,140	0,42%	0,089	0,26%
	Positivo moderado	33,16	0,169	0,51%	0,207	0,62%

Table 20 Reprodutibilidade no ELiTe InGenius (continued)

Alvo	Tipo de amostra	Ct média	Entre instrumentos		Entre lotes	
			SD	% CV	SD	% CV
VIM	Positivo baixo	36,02	0,444	1,23%	0,489	1,36%
	Positivo moderado	34,50	0,289	0,84%	0,412	1,19%
IMP	Positivo baixo	37,18	0,291	0,78%	0,549	1,48%
	Positivo moderado	35,21	0,575	1,63%	0,783	2,22%
IC	n.a.	29,17	0,397	1,36%	0,911	3,12%

A reprodutibilidade do ensaio foi verificada no instrumento **ELiTe BeGenius** através da análise de um painel de amostras de esfregaço retal, incluindo uma amostra negativa e quatro amostras positivas reforçadas com materiais de referência de cada estirpe a baixa concentração.

Um exemplo de resultados de reprodutibilidade no ELiTe BeGenius é mostrado na tabela seguinte.

Table 21 Reprodutibilidade entre lotes no ELiTe BeGenius

Amostra	N	NDM VIM IMP			KPC			OXA			% Concordância
		Ct médio	DP de Ct	%CV	Ct médio	DP de Ct	%CV	Ct médio	DP de Ct	%CV	
Negativo	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100%
NDM + OXA-48	12	34,10	0,30	0,89	-	-	-	33,34	0,40	1,20	100%
VIM + KPC	12	31,14	0,31	1,00	30,10	0,24	0,80	-	-	-	100%
IMP + OXA-181	12	32,69	0,43	1,31	-	-	-	34,35	0,25	0,74	100%

Table 22 Reprodutibilidade inter-instrumento no ELiTe BeGenius

Amostra	N	NDM VIM IMP			KPC			OXA			% Concordância
		Ct médio	DP de Ct	%CV	Ct médio	DP de Ct	%CV	Ct médio	DP de Ct	%CV	
Negativo	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100%
NDM + OXA-48	12	34,23	0,31	0,91	-	-	-	33,49	0,48	1,43	100%
VIM + KPC	12	31,24	0,21	0,68	30,13	0,25	0,83	-	-	-	100%
IMP + OXA-181	12	34,12	1,28	3,74	-	-	-	34,89	1,18	3,37	100%

No teste de reprodutibilidade, o CRE 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%.

11.9 Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi avaliada através da análise de algumas amostras de esfregaços retais e hemoculturas negativas para CRE.

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

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 23 Especificidade do diagnóstico

Amostras	N	positivo	negativo	% de especificidade do diagnóstico
Esfregaços retais negativos para CRE	52	0	52	100%
Hemocultura negativa para CRE	45	2	43	95,5%

O valor-limite de Ct do IC está definido para 34 para amostras de esfregaço retal e hemocultura quando testadas com o ELITE InGenius e o ELITE BeGenius.

11.10 Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada através da análise de amostras de esfregaço retal e hemoculturas, positivas para CRE ou reforçadas com isolados de CRE.

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

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 24 Sensibilidade de diagnóstico

Amostras	N	positivo	negativo	% de sensibilidade de diagnóstico
Esfregaço retal positivo para KPC	25	25	0	100%
Esfregaço retal positivo para VIM	4	4	0	
Esfregaço retal positivo para OXA-48	1	1	0	
Esfregaço retal reforçado com KPC (isolado 207-1 KPC-3)	12	12	0	
Esfregaço retal reforçado com KPC (isolado B1 KPC-2)	12	11	1	
Esfregaço retal reforçado com NDM (isolado NDM-1)	12	12	0	
Esfregaço retal reforçado com NDM (isolado NDM-5)	12	12	0	
Esfregaço retal reforçado com VIM (isolado VIM-1)	12	12	0	
Esfregaço retal reforçado com VIM (isolado VIM-4)	12	12	0	
Esfregaço retal reforçado com IMP (isolado <i>K. pneumoniae</i> AR-Bank 0034)	12	12	0	
Esfregaço retal reforçado com IMP (isolado <i>E. coli</i> NCTC 13476)	12	12	0	
Esfregaço retal reforçado com OXA-48-like (isolado OXA-48)	12	12	0	
Esfregaço retal reforçado com OXA-48 (isolado OXA-232)	12	12	0	
Hemocultura positiva para KPC	16	16	0	
Hemocultura positiva para OXA-48	5	5	0	
Hemocultura positiva para NDM	4	4	0	
Hemocultura positiva para IMP	2	2	0	
Hemocultura positiva para VIM	2	2	0	
Hemocultura reforçada com OXA-48	5	5	0	
Hemocultura reforçada com NDM	5	5	0	
Hemocultura reforçada com VIM	5	5	0	
Hemocultura reforçada com IMP	5	5	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 na Secção 7 do Ficheiro técnico do produto "CRE ELITE MGB® Kit", FTP RTS200ING.

12 REFERÊNCIAS

L. S. Tzouveleakis et al. (2012) *Clin. Microbiol. Rev.* 25(4): 682 - 707.

13 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Utilize este produto apenas com as seguintes amostras clínicas: esfregaços retais e hemocultura.

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

Não utilize amostras com demasiada matriz fecal com este produto: as amostras com elevada turvação inibem a reação de amplificação do ácido nucleico e podem causar resultados inválidos.

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

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

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

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

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

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

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

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

Um resultado negativo obtido com este produto significa que o ADN alvo não foi detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode negligenciar-se o facto de o ADN alvo ter um título mais baixo que o limite de deteção do produto (Ver Características de desempenho, página 15). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

Um resultado negativo no seguimento de um resultado positivo pode ou não indicar o sucesso da erradicação.

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

Embora raros, polimorfismos na região do ADN bacteriano abrangidos pelos primers e sondas do produto podem prejudicar a deteção.

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.

14 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Table 25

Reação de Positive Control inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da PCR Mix e do Positive Control (Controlo positivo). Verifique os volumes da PCR Mix e do Positive Control.
Degradação da PCR Mix.	Não use a PCR Mix durante mais de 4 sessões independentes (3 horas cada no bloco de refrigeração da Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit). Não deixe a PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos. Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Degradação da Positive Control.	Não use o Positive Control para mais de 4 sessões independentes (3 horas cada na área de extração ou na Cooler Unit). Utilize uma nova alíquota da Positive Control.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELiTechGroup.

Table 26

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

Table 27

Reação da amostra inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da PCR Mix, do Controlo Interno e da amostra. Verifique os volumes da PCR Mix, do Controlo Interno e da amostra.
Degradação da PCR Mix.	Não use a PCR Mix para mais de 4 sessões independentes (3 horas cada na Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit). Não deixe a PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos. Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Degradação do modelo do Controlo Interno.	Utilize uma nova alíquota de Controlo Interno.

Table 27 (continued)

Reação da amostra inválida	
Causas possíveis	Soluções
Inibição devido a substâncias interferentes na amostra.	Repita a amplificação “conforme está” ou com uma diluição de 1:2 em água de grau para biologia molecular de amostra de eluato numa sessão “PCR only” (Apenas PCR). Repita a extração com uma diluição 1:2 em água de grau de biologia molecular da amostra numa sessão “Extract + PCR” (Extrair+ PCR).
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 28

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 29

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

15 SÍMBOLOS



Número de catálogo.



Limite máximo da temperatura.



Código de lote.



Prazo de validade (último dia do mês).



Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*.



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



Identificação única do dispositivo



Contém suficiente para "N" testes.



Consultar as instruções de utilização.



Conteúdo.



Manter afastado da luz solar.



Fabricante.

16 NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA

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

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

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

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

MGB®, Eclipse Dark Quencher®, AquaPhluor®, ELITe MGB®, o logotipo ELITe MGB®, ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® são marcas registadas do ELITechGroup na União Europeia.
eSWAB® é uma marca comercial registada da COPAN Italia S.p.A.

Appendix A CRE 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 **CRE ELITE MGB® Kit** consiste num dispositivo médico de diagnóstico in vitro destinado a ser utilizado pelos profissionais de saúde como um ensaio qualitativo de PCR em tempo real de ácidos nucleicos para a deteção de ADN de genes de resistência à carbapenema* (KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48-like) de *Enterobacteriaceae*.

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 esfregaços retais e hemocultura.

O produto está previsto para utilização como auxiliar no diagnóstico e rastreio de infeções por *Enterobacteriaceae* positivas para genes de resistência à carbapenema, em associação com os dados clínicos do paciente e outros resultados de testes laboratoriais.

O produto é também compatível com a caracterização de *Enterobacteriaceae* positivas para genes de resistência à carbapenema em amostras de ADN extraídas de isolado de cultura.

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

*Para a lista completa das variantes genéticas detetadas por este produto, consulte [11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO page 18](#)

Sequência amplificada

Sequência	Gene	Fluoróforo	Canal
Alvo 1	Família de genes KPC	FAM	KPC
Alvo 2	Família de genes NDM, VIM, IMP	AP593	NDM VIM IMP
Alvo 3	Família de genes OXA-48-like	AP639	OXA
Internal Control	sequência artificial IC2	AP525	IC

Matriz validada

› Esfregaço retal
› Hemocultura

Conteúdo do Kit e produtos relacionados

CRE ELITE MGB Kit (RTS200ING)		CRE- ELITE Positive Control (CTR200ING)	
 X 8		 X 3	
CRE PCR Mix 8 tubos de 280 µL 12 reações por tubo 96 reações por kit 4 ciclos de congelamento-descongelamento por tubo		CRE Positive Control 3 tubos de 160 µL 4 reações por tubo 12 reações por kit 4 ciclos de congelamento-descongelamento	
Prazo de conservação máximo:	24 meses	Prazo de conservação máximo	24 meses
Temperatura de armazenamento	≤ -20°C	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. › Consumíveis do ELITE InGenius e ELITE BeGenius (ver instruções de utilização do ELITE InGenius e do ELITE BeGenius)	› CPE - Internal Control: CTRCPE › eNAT™ kit (Copan, ref.606CS01R), › FecalSwab™ (COPAN,, ref. 470CE)
--	---

Protocolo ELITE InGenius e ELITE BeGenius

› Volume da amostra › Volume CPE › Volume de eluição total	200 µL 10 µL 100 µL	› Volume de entrada de PCR eluato › Volume de PCR Mix › Frequência dos controles	20 µL 20 µL 15 dias
--	---------------------------	--	---------------------------

Desempenhos ELITE InGenius e ELITE BeGenius

Matriz	Alvo	Limite de detecção	Sensibilidade	Especificidade
Zaragatoa retal	KPC	99 CFU / mL	100%	100%
	NDM	144 CFU / mL		
	VIM	399 CFU / mL		
	IMP	273 CFU / mL		
	OXA-48	300 CFU / mL		
	OXA-181	179 CFU / mL		
Hemocultura	KPC	N.A.	100 %	95,5%
	NDM	N.A.		
	VIM	N.A.		
	IMP	N.A.		
	OXA-48	N.A.		
	OXA-181	N.A.		

N.A. = não aplicável

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
hemocultura	-	≤ 24 horas	-	-	-
esfregaço retal	colhido em eNAT™ kit	-	≤ 1 mês	≤ 6 meses	Períodos longos
esfregaço retal	colhido em FecalSwab™ kit	-	≤ 3 dias	-	-

Antes da análise, dilua a hemocultura numa relação de 1:1000 em água ultrapurificada (pelo menos 10 µL de amostras em 10 mL de água ultrapurificada), misture por meio de vórtice e transfira 0,2 mL de amostras diluídas para um tubo de extração (para o instrumento ELITE InGenius) ou para um tubo Sarstedt de 2 mL (para o instrumento ELITE BeGenius).

Antes da análise do esfregaço retal, deve transferir 0,5 mL de amostra em meio FecalSwab™ para um tubo eNAT™ limpo com 2,0 mL de meio, agitado em vórtice. Após a adição de 0,5 mL de amostra ao meio FecalSwab™, o tubo eNAT™ pode ser colocado diretamente no sistema como um tubo primário. As amostras diluídas no meio eNAT™ podem ser armazenadas nas mesmas condições indicadas na tabela acima.

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 controlos: Positive Control e Negative Control no menu “Controls” (Controlos). Nota: Ambos devem ter sido executados, aprovados e não ter expirado.	3. Descongele a PCR Mix e os tubos de CTRCPE . Submeta a vórtice suave. Centrifugue durante 5 s.
--	--	--

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

1. Selecione “Perform Run” (Executar) no ecrã tátil	2. Verifique os volumes de extração: Entrada: “200 µL”, eluição: “100 µL”	3. Leia os códigos de barras das amostras com um leitor de códigos de barras manual ou escreva a identificação da amostra
4. Selecione o “Assay protocol” (Protocolo de ensaio) de interesse: CRE ELiTe RcS_200_100 ou CRE ELiTe BC_200_100	5. Selecione o método “Extract + PCR” (Extrair+PCR) e a posição da amostra: Extraction Tube (Tubo de extração)	6. Carregue a PCR Mix e o Internal Control no Inventory Block (Gestor do reagente)
7. Carregue as PCR Cassettes, os cartuchos de extração ELiTe InGenius SP 200 e todos os consumíveis e amostras necessários para serem extraídos	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, controlos)

1. Selecione “Perform Run” (Executar) no ecrã tátil	2. Verifique os volumes de extração: Entrada: “200 µL”, eluição: “100 µL”	3. Leia os códigos de barras das amostras com um leitor de códigos de barras manual ou escreva a identificação da amostra
4. Selecione o “Assay protocol” (Protocolo de ensaio) de interesse: CRE ELiTe RcS_200_100 ou CREn ELiTe BC_200_100 ou CRE ELiTe_PC ou CRE ELiTe_NC	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: PCR cassette, Cartucho de extração, Tubo de eluição, Cassete de pontas, Racks do tubo de extração	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 controlos: Positive Control e Negative Control no menu “Controls” (Controlos). Nota: Ambos devem ter sido executados, aprovados e não ter expirado.	3. Descongele a PCR Mix e os tubos de CTRCPE . Submeta a vórtice suave. Centrifugue durante 5 s.
--	--	--

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

1. Selecione “Perform Run” (Executar) no ecrã tátil e, a seguir, clique no modo de execução “Extract + PCR” (Extrair+PCR)	2. Insira o rack de amostras com as amostras com código de barras na Cooler Unit. A leitura do código de barras já se encontra ativada	3. Verifique os volumes de extração: Entrada: “200 µL”, eluato: “100 µL”
4. Selecione o “Assay protocol” (Protocolo de ensaio) de interesse: CRE ELiTe_Be_RcS_200_100 ou CRE ELiTe_Be_BC_200_100 Nota: Se for realizada uma segunda extração, repita os passos 2 a 4	5. Imprima as etiquetas para colocar um código de barras nos tubos de eluição vazios. Carregue os tubos no rack de eluição e insira-o na Cooler Unit	6. Carregue a PCR Mix e o Internal Control no rack de reagente/eluição e insira-o na Cooler Unit
7. Carregue o “PCR Rack” 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, controlos)

1. Selecione “Perform Run” (Executar) no ecrã tátil e, a seguir, clique no modo de execução “PCR Only” (Apenas PCR)	2. Carregue os tubos com código de barras do ácido nucleico extraído ou dos controlos no rack de eluição e insira-o na Cooler Unit.	3. Para os <u>Controlos</u> : 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). Para os <u>eluatos</u> : 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: CRE ELiTe_Be_RcS_200_100 ou CRE ELiTe_Be_BC_200_100 ou CRE ELiTe_Be_PC ou CRE ELiTe_Be_NC	5. Carregue a PCR Mix no rack de reagente/eluição e insira-o na Cooler Unit	6. Carregue o “PCR Rack” com “PCR Cassette”
7. Feche a porta. Iniciar a execução	8. Visualize, aprove e guarde os resultados	



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