

Instructions for use

Coagulation ELITe MGB® Kit

reagentes para PCR em tempo real do ADN



REF RTSD00ING

UDI 08033891486204

CE
0123

IVD

HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES

Rev.	Aviso de alteração	Data (dd/mm/aa)
09-R	Correção de uma gralha nas tabelas dos testes de repetibilidade e reprodutibilidade e no texto introdutório aos testes: a mutação G1691A foi incorretamente indicada como associada ao FII em vez do FV, tendo-se invertido esta situação com a mutação G20210A.	09/03/26
08-R	Alteração do produto RTSD00ING para a deteção como singleplex para os analitos FII, FV, MTHFR e duplex para FII-FV. Extensão para 60 dias de utilização a partir da primeira abertura. Novos gráficos e definição de conteúdos das instruções de utilização.	27/08/25
07-R	Atualização para conformidade com o Regulamento (UE) 2017/746 em matéria de requisitos de dispositivo médico para diagnóstico in vitro (IVDR). A composição e as CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO do produto permanecem inalteradas.	20/08/24
05	Extensão de utilização com o instrumento ELiTe BeGenius Descrição do valor de corte de IC já adotado no protocolo de ensaio do produto (secção "Concordância diagnóstica: confirmação do genótipo da amostra certificada")	30/03/23
04	Atualização do valor IC Ct e do intervalo Tm do Fator II e do Fator V	24/05/22
03	forneceu condições de armazenamento de amostras mais permissivas, em conformidade com a literatura disponível e que não afetam a segurança e o desempenho do produto.	09/03/22
00-02	desenvolvimento de novo produto e alterações subsequentes	—

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	8
9 PROCEDIMENTO do ELITe InGenius	10
10 PROCEDIMENTO do ELITe BeGenius	15
11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	20
12 REFERÊNCIAS	28
13 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	28
14 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	29
15 SÍMBOLOS.....	31
16 NOTIFICAÇÃO PARA OS UTILIZADORES.....	32
17 NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	32
Appendix A QUICK START GUIDE.....	33

1 UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto **Coagulation ELITe MGB® Kit** é um dispositivo médico de diagnóstico in vitro que se destina a ser usado por profissionais de saúde como um ensaio de PCR em tempo real dos ácidos nucleicos qualitativos para a discriminação alélica dos seguintes três locos:

- gene do fator V de coagulação, polimorfismo do nucleótido único (SNP) G1691A (Leiden),
- gene do fator II da coagulação, SNP G20210A,
- gene da 5,10-metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), SNP C677T.

em singleplex, duplex (FII e FV) ou triplex (FII, FV e MTHFR) em amostras de ADN genômico humano extraídas 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 sangue total colhidas em EDTA.

O produto está previsto para utilização como auxiliar na avaliação do risco de trombose venosa profunda, em pacientes com suspeita de alterações na coagulação e em risco de trombose venosa profunda.

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

2 PRINCÍPIOS DO ENSAIO

O ensaio é uma PCR qualitativa em tempo real para a discriminação alélica do gene do fator V da coagulação, polimorfismo de nucleótido único (SNP) G1691A (Leiden), do gene do fator II da coagulação, SNP G20210A, e do gene da 5,10-metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), SNP C677T, em ADN isolado de amostras e amplificado utilizando o reagente do ensaio **52M PCR Mix**, que contém primers e sondas com tecnologia ELITe MGB.

As sondas ELITe MGB 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). No fim do ciclo de amplificação, a análise da curva de fusão permite identificar as temperatura de fusão das sondas e detetar a presença do tipo selvagem e/ou de alelos mutados.

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 **Coagulation ELITe MGB Kit** fornece o reagente do ensaio **52M PCR Mix**, uma mistura de PCR otimizada e estabilizada que contém os primers e sondas específicos de:

- gene do Fator V da coagulação, região SNP G1691A (Leiden), detetado no Canal **FV**; a sonda é estabilizada por MGB, inativada pelo Eclipse Dark Quencher® e identificada pelo corante AquaPhluor® 639 (AP639),
- o gene do Fator II da coagulação, detetado no Canal **FII**; a sonda é estabilizada por MGB, inativada pelo Eclipse Dark Quencher e identificada com corante FAM,
- gene MTHFR, região SNP C677T, detetado no Canal **MTHFR**, a sonda é estabilizada por MGB, inativada pelo Eclipse Dark Quencher, e identificada pelo corante AquaPhluor® 593 (AP593),
- Internal Control (**IC**), baseado na sequência genómica **dabeta globina humana**, detetado no Canal **IC**; a sonda é estabilizada por MGB, inativada pelo Eclipse Dark Quencher e marcada com corante AquaPhluor 525 (AP525).

A52M PCR Mix também contém tampão, cloreto de magnésio, trifosfatos de nucleótido e hot-start DNA Polimerase.

O Coagulation 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.

4 MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Table 1

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
52M PCR Mix ref. RTSD00ING	Mistura de reagentes para o tubo de PCR em tempo real com tampa NATURAL	8 x 280 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 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	Produto e reagentes
ELiTe InGenius (ELiTechGroup S.p.A., EG SpA, ref. INT030) Software ELiTe InGenius versão 1.3.0.19 (ou mais recente) 52M ELiTe_PC, protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Positive Control 52M ELiTe_NC, protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Negative Control 52M ELiTe_WB_200_200, protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostra do sangue total 52M ELiTe_FII_WB_200_200, protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostra do sangue total 52M ELiTe_FV_WB_200_200, protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostra do sangue total 52M ELiTe_MTHFR_WB_200_200, protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostra do sangue total 52M ELiTe_FVFII_WB_200_200, protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostra do sangue total	Coagulation - ELiTe Positive Control (EG SpA, ref. CTRD00ING) ELiTe InGenius SP200 (EG SpA, ref. INT032SP200) Consumíveis ELiTe InGenius e ELiTe BeGenius (ver instruções de utilização ELiTe InGenius e ELiTe BeGenius)
ELiTe BeGenius (EG SpA, ref. INT040) Software ELiTe BeGenius versão 2.3.0 (ou mais recente) 52M ELiTe_Be_PC, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para análise do Positive Control. 52M ELiTe_Be_NC, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para análise do Negative Control 52M ELiTe_Be_WB_200_200, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para análise de amostra do sangue total 52M ELiTe_FII_Be_WB_200_200, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para análise de amostra do sangue total 52M ELiTe_FV_Be_WB_200_200, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para análise de amostra do sangue total 52M ELiTe_MTHFR_Be_WB_200_200, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para análise de amostra do sangue total 52M ELiTe_FVFII_Be_WB_200_200, Assay Protocol (Protocolo de ensaio) com parâmetros para análise de amostra do sangue total	

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, 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, 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)
52M PCR Mix	-20°C ou inferior (protegido da luz)	60 dias	até sete	até sete sessões* separadas de cerca de três horas cada ou até 7 horas consecutivas (2 sessões de cerca de 3 horas cada e o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão)

*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
Sangue Total	EDTA	≤ 3 d	≤ 7 d	≤ 30 d	≤ 1 ano

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

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

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

Table 5 Protocolos de ensaio para oCoagulation ELITE MGB Kit

Amostra	Instrumento	Nome do protocolo de ensaio	Relatório	Características
Sangue total em EDTA	ELITE InGenius	52M ELITE_WB_200_200 52M ELITE_FII_WB_200_200 52M ELITE_FV_WB_200_200 52M ELITE_MTHFR_WB_200_200 52M ELITE_FVFII_WB_200_200	Tipo selvagem / heterozigótico / homozigótico	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 200 µL Internal Control: NÃO Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
	ELITE BeGenius	52M ELITE_Be_WB_200_200 52M ELITE_FII_Be_WB_200_200 52M ELITE_FV_Be_WB_200_200 52M ELITE_MTHFR_Be_WB_200_200 52M ELITE_FVFII_Be_WB_200_200	Tipo selvagem / heterozigótico / homozigótico	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 200 µL Internal Control: NÃO 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 oELITE InGeniusou oELITE BeGenius, seguindo as instruções de utilização do kit de extração**ELITEInGeniusSP200**(EG SpA, ref. INT032SP200)

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

Se necessário, 200 de amostra devem ser transferidos para um tubo de extração (para oELITE InGenius) ou para um tubo Sarstedt de 2 mL (para oELITE BeGenius).

NOTE

A pipetagem de amostras para o**tubo de extração**ou para o**tubo Sarstedt de 2 mL**podegerar contaminação. Utilize as pipetas adequadas e siga todas as recomendações reportadas na secção7 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 20](#)para verificar os dados relativos a substâncias interferentes.

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 **Coagulation - ELITE Positive Control** (não fornecido com este kit) com os protocolos de ensaio **52M ELITE_PC** ou **52M ELITE_Be_PC**.
- Para o Negative Control, utilize água de grau biológico molecular (não fornecida com este kit) com os protocolos de ensaio **52M ELITE_NC** ou **52M 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 os Positive e Negative Controls. Os controlos 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 **Coagulation 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

O **Coagulation ELiTe MGB Kit** pode ser usado no **ELiTe InGenius** para realizar:

- Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR]),
- Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR]),

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.) 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.
2	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home".	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Início).	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Início).
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 200 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 200 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 200 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.	Não aplicável
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")	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.
6	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).

Table 7 (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])
7	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]).
8	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
9	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.	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.
10	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	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.	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.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
13	Carregue a PCR Cassette , os cartuchos de extração ELITE InGenius SP 200 e todos os consumíveis e amostras necessários para serem extraídos	Carregue a PCR Cassette e os tubos de eluição com as amostras extraídas	Carregue os tubos de PCR Cassette, Positive Control e Negative Control.
14	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
15	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
16	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 $-20 \pm 10^{\circ}\text{C}$ 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 (durante 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, o **Positive Control** restante deve ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20°C ou menos. Evite o derrame de **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 **Coagulation 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.

9.3.1 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 e Tm resultantes são usados para verificar o sistema (lote de reagentes e instrumento).

Os resultados do Positive Control e do Negative Control, específicos para o lote de reagente de PCR, são guardados na base de dados (controles). 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.

9.3.2 Validação dos resultados da amostra

O **ELITE InGenius Software** interpreta os resultados de PCR para os alvos (canais **FV**, **FII**, **MTHFR**) e o Internal Control (canal **IC**) com os parâmetros do protocolo de ensaio **52M ELITE_WB_200_200**, **52M ELITE_FII_WB_200_200**, **52M ELITE_FV_WB_200_200**, **52M ELITE_MTHFR_WB_200_200** ou **52M ELITE_FVFI_WB_200_200**.

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
52M Positive Control	APROVADO
2) Negative Control	Estado
Negative Control de 52M	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 apresenta uma combinação das seguintes mensagens, especificando se os alelos alvo são discriminados, com base no protocolo de ensaio selecionado (singleplex, duplex ou triplex).

Table 9

Resultado da execução da amostra	Interpretação
FV:Wild-type for Factor V FV: Tipo selvagem para o Fator V	A amostra possui um genótipo de tipo selvagem para o Fator V SNP loco G1691A.
FV:Heterozygous for Factor V Leiden FV: Heterozigótico para o Fator V Leiden	A amostra possui um genótipo heterozigótico mutado (Leiden) para o Fator V SNP loco G1691A.
FV:Homozygous for Factor V Leiden FV: Homozigótico para o Fator V Leiden	A amostra possui um genótipo homozigótico mutado (Leiden) para o Fator V SNP loco G1691A.
FII:Wild-type for Factor II FII: Tipo selvagem para o Fator II	A amostra possui um genótipo de tipo selvagem para o Fator II SNP loco G20210A.
FII:Heterozygous for Factor II 20210A FII: Heterozigótico para o fator II 20210A	A amostra possui um genótipo heterozigótico mutado (20210A) para o Fator V SNP loco G20210A.
FII:Homozygous for Factor II 20210A FII: Homozigótico para o fator II 20210A	A amostra possui um genótipo homozigótico mutado (20210A) para o Fator V SNP loco G20210A.
MTHFR:Wild-type for MTHFR MTHFR: Tipo selvagem para MTHFR	A amostra possui um genótipo de tipo selvagem para o MTHFR SNP loco C677T.
MTHFR:Heterozygous for MTHFR 677T MTHFR: Heterozigótico para o MTHFR 677T	A amostra possui um genótipo heterozigótico mutado (677T) para o MTHFR SNP loco C677T.
MTHFR:Homozygous for MTHFR 677T MTHFR: Homozigótico para o fator MTHFR 677T	A amostra possui um genótipo homozigótico mutado (677T) para o MTHFR SNP loco C677T.
IC:Valid Sample (CI: Amostra válida)	A amostra possui um valor Ct do IC menor que 26,5 e é válida
Inconclusive-Retest Sample Inconclusivo - Volte a testar a amostra	Resultado do ensaio inconclusivo devido a um problema na amostra.
Invalid-Retest Sample (Inválido-Testar novamente a amostra)	Resultado do ensaio inválido devido a falha do Internal Control (p. ex., extração incorreta, transferência de inibidores). O teste deve ser repetido.

Amostras reportadas como “Inconclusivo - Voltar a testar a amostra” não são adequadas para a interpretação dos resultados, devido a não ter sido possível detetar a temperatura de fusão (T_m) dos alelos selvagem e mutados. Neste caso, a análise da curva de dissociação não foi realizada com êxito devido a problemas na amostra (transferência de inibidores na eluição ou presença de outro SNP interferentes), que pode causar resultados incorretos.

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 [14 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS page 29](#)).

NOTE

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

NOTE

Ao aprovar os resultados do ensaio, certifique-se sempre de verificar o resultado do instrumento, observando os gráficos da curva de fusão no relatório da sessão de trabalho. As temperaturas de fusão (T_m) do tipo selvagem e/ou alelos mutados de cada gene na análise têm de corresponder aos picos mostrados nos gráficos da curva de fusão.

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).

9.3.3 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 do track).
- 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 **Coagulation 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

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

- Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR]),
- Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR]),
- Execução 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.	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. Cada tubo é suficiente para 4 reações. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. 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.
2	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".
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	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" .	Selecione o "Run mode": "PCR Only" .
5	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".
6	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), o "Extracted eluate vol." (Volume de eluato extraído) e o Internal Control.	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).
7	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
8	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 200 µL	Não aplicável	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").	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.	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 Positivo e Negative Control (PCR Only [apenas PCR])
	NOTE Quando forem processadas mais de 12 amostras, repita o procedimento a partir do ponto 6.		Não aplicável
11	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
12	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
13	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Não aplicável	Não aplicável
14	Carregue 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).
15	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).	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).
16	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
17	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.
18	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
19	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.
20	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
21	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

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])
22	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
23	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 7 horas (durante 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, 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 **Coagulation 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

Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica do Coagulation ELITE MGB Kit foi definida no ELITE InGenius (modo apenas PCR) e verificada no ELITE BeGenius (modo apenas PCR) através do teste de três amostras (tipo selvagem, heterozigótica e homozigótica) em 4 réplicas com cerca de 70 ng por reação, adicionadas a painéis de ADN genómico humano certificado para o Fator V e o Fator II (WHO Reference Reagent Factor V Leiden, Human gDNA, 1st International Genetic International Panel, NIBSC, Reino Unido, código 04/224 e WHO Reference Reagent Prothrombin Mutation G20210A, Human gDNA, 1st International Genetic International Panel, NIBS, Reino Unido, código 05/130).

A sensibilidade analítica deste ensaio permite identificar a presença de cerca de 20.000 moléculas de ADN alvo (correspondente a genomas de ~ 10.000 células ou ~ 70 ng de ADN genómico humano) em 20 µL de ADN extraído na reação.

Eficiência da deteção (inclusividade)

A inclusividade do ensaio, como a eficiência da deteção dos genes Fator V, Fator II e MTHFR, foi avaliada por análise in silico. A análise revelou um elevado nível de conservação da sequência e a ausência de mutações significativas. Por isso, é esperada uma amplificação e deteção eficazes.

As sondas fluorescentes permitem detetar os alelos dos genes do Fator V, Fator II e MTHFR constantes da seguinte tabela. Os limites de intervalos de Tm relacionados para o ELITE InGenius e ELITE BeGenius foram calculados analisando dados obtidos em estudos de verificação e validação e os intervalos de Tm utilizados são mostrados na tabela seguinte.

Table 12

Gene	Alelo detetado	Intervalo Tm	
		ELITE InGenius	ELITE BeGenius
Fator V	Alelo 1691G (tipo selvagem)	53,0 °C – 57,0 °C	52,5 °C – 56,5 °C
	Alelo 1691A (mutado, Leiden)	61,0 °C – 65,0 °C	59,5 °C – 63,5 °C
Fator II	Alelo 20210G (tipo selvagem)	56,0 °C – 61,0 °C	55,0 °C – 60,0 °C
	Alelo 20210A (mutado)	64,0 °C – 69,0 °C	63,0 °C – 68,0 °C
MTHFR	Alelo MTHFR 677C (tipo selvagem)	55,0 °C – 59,0 °C	54,0 °C – 58,0 °C
	Alelo MTHFR 677T (mutado)	64,0 °C – 68,0 °C	63,0 °C – 67,0 °C

Especificidade analítica

A Especificidade Analítica deste ensaio, bem como a capacidade de não identificar como Fator II mutado para SNP G20210A o gene mutado para SNP C20209T foram verificadas usando ADN de plasmídeo que contém o amplicon do Fator II com nucleotídeo de tipo selvagem (G) na posição 20210 e o nucleotídeo mutante (T) na posição 20209.

Além disso, foi verificada a Especificidade Analítica para os seguintes SNP pouco usuais descritos na literatura científica. Existem SNP raros que se enquadram nas proximidades dos SNP de interesse:

Table 13

Gene	SNP raro analisado
Fator V	G1689A, C1690T, A1692C, A1696G
Fator II	A20207C, A20218G, T20219A, C20221T
MTHFR	C678A, G679A, C684G

A Especificidade Analítica foi verificada usando ADN de plasmídeo contendo a região amplificada dos genes do Fator V, Fator II e MTHFR com o nucleótido de tipo selvagem nos SNP de interesse e o nucleótido mutante nos SNP raros em análise.

Amostras simuladas contendo cerca de 80.000 cópias de ADN de plasmídeo foram testadas em 6 réplicas (e 24 réplicas para SNP C20209T) no ELITe InGenius. Todas as réplicas foram consideradas “inconclusivas” ou corretamente determinadas. Nenhuma amostra mutada para SNP em análise foi designada de heterozigótica ou homozigótica mutada para o SNP de interesse.

SNP raros que se enquadram na região de hibridização da sonda podem interferir na detecção do SNP de interesse e originar um “mutante homozigótico falso” quando ocorrer em simultâneo com a mutação do SNP de interesse no outro alelo.

Organismos potencialmente interferentes: Reatividade cruzada

A potencial reatividade cruzada com outros organismos indesejados que podem ser encontrados em amostras clínicas de plasma e sangue total foi avaliada pela comparação *in silico* das sequências disponíveis nas bases de dados de nucleótidos. A análise revelou a ausência de homologias significativas. Por conseguinte, não se prevê que haja reatividade cruzada por organismos potencialmente interferentes.

Organismos potencialmente interferentes: Inibição

A potencial inibição por outros organismos que podem ser encontrados em amostras clínicas de plasma e sangue total foi avaliada pela comparação *in silico* das sequências disponíveis nas bases de dados de nucleótidos.

A análise revelou a ausência de homologias significativas. Por conseguinte, não se prevê que ocorra a inibição por organismos potencialmente interferentes.

Substâncias interferentes

O efeito de substâncias potencialmente interferentes foi avaliado através da análise da amostra de sangue total colhida em EDTA, heterozigótico para os três genes de interesse, reforçado com as seguintes substâncias potencialmente interferentes em concentrações relevantes.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte:

Table 14

Amostra	Genótipo FV het / FII het / MTHFR het	Resultado
Controlo	3 / 3	Sem interferência
Ciclosporina A	3 / 3	Sem interferência
Ganciclovir	3 / 3	Sem interferência
Heparina	3 / 3	Sem interferência
EDTA	3 / 3	Sem interferência
Ibuprofeno	3 / 3	Sem interferência
Triglicéridos	3 / 3	Sem interferência

Table 14 (continued)

Controlo	3 / 3	Sem interferência
Ampicilina	3 / 3	Sem interferência
Bilirrubina	3 / 3	Sem interferência

Repetibilidade

A repetibilidade intra-sessão e inter-sessão dos resultados obtidos com o Coagulation ELITE MGB Kit em associação com os instrumentos ELITE InGenius e ELITE BeGenius foi testada através da análise de um painel de sangue total colhido em EDTA, incluindo uma amostra de genótipo heterozigótico para cada alvo (FII SNP G20210A, FV SNP G1691A heterozigótico (Leiden) e MTHFR SNP C677T).

Um exemplo dos resultados da repetibilidade intra-sessão no ELITE InGenius é mostrado nas tabelas seguintes.

Table 15 Repetibilidade intra-sessão no ELITE InGenius

Amostra de painel	Alvo	N	Ct médio	%CV Ct
Heterozigótico FII SNP G20210A	IC	8	22,07	0,41
Heterozigótico FV SNP G1691A		8	22,91	0,76
Heterozigótico MTHFR SNP C677T		8	22,02	1,22

Table 16 Repetibilidade intra-sessão no ELITE InGenius

Amostra de painel	Alelo	N	Tm média	%CV Ct
Heterozigótico FII SNP G20210A	Fator II tipo selvagem	8	58,19	0,207
	Fator II mutado	8	65,66	0,051
Heterozigótico FV SNP G1691A	Fator V tipo selvagem	8	55,18	0,048
	Fator V mutado	8	62,31	0,120
Heterozigótico MTHFR SNP C677T	MTHFR tipo selvagem	8	56,73	0,183
	MTHFR mutado	8	65,90	0,169

Um exemplo dos resultados da repetibilidade intrer-sessão no ELITE InGenius é mostrado nas tabelas seguinte.

Table 17 Repetibilidade inter-sessão no ELITE InGenius

Amostra de painel	Alvo	N	Ct médio	%CV Ct
Heterozigótico FII SNP G20210A	IC	16	22,12	1,12
Heterozigótico FV SNP G1691A		16	22,91	0,75
Heterozigótico MTHFR SNP C677T		16	22,10	1,36

Table 18 Repetibilidade inter-sessão no ELiTe InGenius

Amostra de painel	Alelo	N	Tm média	%CV Ct
Heterozigótico FII SNP G20210A	Fator II tipo selvagem	16	58,18	0,182
	Fator II mutado	16	65,78	0,258
Heterozigótico FV SNP G1691A	Fator V tipo selvagem	16	55,18	0,064
	Fator V mutado	16	62,31	0,116
Heterozigótico MTHFR SNP C677T	MTHFR tipo selvagem	16	56,73	0,211
	MTHFR mutado	16	65,96	0,257

Um exemplo dos resultados da repetibilidade intra-sessão no ELiTe BeGenius é mostrado nas tabelas seguintes.

Table 19 Repetibilidade intra-sessão no ELiTe BeGenius

Amostra de painel	Alvo	N	Ct médio	%CV Ct
Heterozigótico FII SNP G20210A	IC	8	22,35	1,90
Heterozigótico FV SNP G1691A		8	22,95	2,20
Heterozigótico MTHFR SNP C677T		8	22,40	1,28

Table 20 Repetibilidade intra-sessão no ELiTe BeGenius

Amostra de painel	Alelo	N	Tm média	%CV Ct
Heterozigótico FII SNP G20210A	Fator II tipo selvagem	8	57,64	0,392
	Fator II mutado	8	65,21	0,150
Heterozigótico FV SNP G1691A	Fator V tipo selvagem	8	54,84	0,120
	Fator V mutado	8	61,56	0,242
Heterozigótico MTHFR SNP C677T	MTHFR tipo selvagem	8	56,29	0,174
	MTHFR mutado	8	65,30	0,116

Um exemplo dos resultados da repetibilidade intrer-sessão no ELiTe BeGenius é mostrado nas tabelas seguintes.

Table 21 Repetibilidade inter-sessão no ELiTe BeGenius

Amostra de painel	Alvo	N	Ct médio	%CV Ct
Heterozigótico FII SNP G20210A	IC	16	22,26	1,58
Heterozigótico FV SNP G1691A		16	23,10	2,02
Heterozigótico MTHFR SNP C677T		16	22,45	1,75

Table 22 Repetibilidade inter-sessão no ELiTe BeGenius

Amostra de painel	Alelo	N	Tm média	%CV Ct
Heterozigótico FII SNP G20210A	Fator II tipo selvagem	16	57,71	0,494
	Fator II mutado	16	65,24	0,119
Heterozigótico FV SNP G1691A	Fator V tipo selvagem	16	54,82	0,131
	Fator V mutado	16	61,60	0,218
Heterozigótico MTHFR SNP C677T	MTHFR tipo selvagem	16	56,29	0,273
	MTHFR mutado	16	65,28	0,099

A repetibilidade em associação com o ELiTe InGenius e o ELiTe BeGenius do Coagulation ELiTe MGB Kit apresentou uma variabilidade máxima dos valores IC Ct e Tm alvo como %CV inferior a 5%.

Reprodutibilidade

A repetibilidade intra-sessão e inter-sessão dos resultados obtidos com o Coagulation ELiTe MGB Kit em associação com o ELiTe InGenius e o ELiTe BeGenius foi testada através da análise de um painel de sangue total colhido em EDTA, incluindo uma amostra de genótipo heterozigótico para cada alvo (FII SNP G20210A, FV SNP G1691A heterozigótico (Leiden) e MTHFR SNP C677T).

A reprodutibilidade interlote e interinstrumento dos resultados obtidos com o Coagulation ELiTe MGB Kit em associação com os instrumentos ELiTe InGenius e ELiTe BeGenius foi testada através da análise de um painel de sangue total colhido em EDTA, incluindo uma amostra de genótipo heterozigótico para cada alvo (FII SNP G20210A, FV SNP G1691A heterozigótico (Leiden) e MTHFR SNP C677T).

Os resultados estão resumidos nas tabelas seguintes.

Table 23 Reprodutibilidade interlote no ELiTe InGenius

Amostra de painel	Alvo	N	Ct médio	%CV Ct
Heterozigótico FII SNP G20210A	IC	16	22,28	1,28
Heterozigótico FV SNP G1691A		16	22,46	2,58
Heterozigótico MTHFR SNP C677T		16	23,14	1,47

Table 24 Reprodutibilidade interlote no ELiTe InGenius

Amostra de painel	Alelo	N	Tm média	%CV Ct
Heterozigótico FII SNP G20210A	Fator II tipo selvagem	16	58,1	0,23
	Fator II mutado	16	65,7	0,12
Heterozigótico FV SNP G1691A	Fator V tipo selvagem	16	55,1	0,10
	Fator V mutado	16	62,3	0,13
Heterozigótico MTHFR SNP C677T	MTHFR tipo selvagem	16	56,6	0,32
	MTHFR mutado	16	65,8	0,22

Table 25 Reprodutibilidade interinstrumento no ELiTe InGenius

Amostra de painel	Alvo	N	Ct médio	%CV Ct
Heterozigótico FII SNP G20210A	IC	16	22,38	1,53
Heterozigótico FV SNP G1691A		16	22,45	2,34
Heterozigótico MTHFR SNP C677T		16	23,13	1,27

Table 26 Reprodutibilidade interinstrumento no ELiTe InGenius

Amostra de painel	Alelo	N	Tm média	%CV Ct
Heterozigótico FII SNP G20210A	Fator II tipo selvagem	16	58,1	0,27
	Fator II mutado	16	65,6	0,12
Heterozigótico FV SNP G1691A	Fator V tipo selvagem	16	55,1	0,21
	Fator V mutado	16	62,2	0,16
Heterozigótico MTHFR SNP C677T	MTHFR tipo selvagem	16	56,6	0,35
	MTHFR mutado	16	65,7	0,28

Table 27 Reprodutibilidade interlote no ELiTe BeGenius

Amostra de painel	Alvo	N	Ct médio	%CV Ct
Heterozigótico FII SNP G20210A	IC	16	22,42	1,72
Heterozigótico FV SNP G1691A		16	22,60	1,99
Heterozigótico MTHFR SNP C677T		16	22,80	2,20

Table 28 Reprodutibilidade interlote no ELiTe BeGenius

Amostra de painel	Alelo	N	Tm média	%CV Ct
Heterozigótico FII SNP G20210A	Fator II tipo selvagem	16	57,6	0,29
	Fator II mutado	16	65,2	0,11
Heterozigótico FV SNP G1691A	Fator V tipo selvagem	16	54,8	0,11
	Fator V mutado	16	61,5	0,24
Heterozigótico MTHFR SNP C677T	MTHFR tipo selvagem	16	56,2	0,27
	MTHFR mutado	16	65,2	0,28

Table 29 Reprodutibilidade interinstrumento no ELITE BeGenius

Amostra de painel	Alvo	N	Ct médio	%CV Ct
Heterozigótico FII SNP G20210A	IC	16	22,51	1,60
Heterozigótico FV SNP G1691A		16	22,63	1,68
Heterozigótico MTHFR SNP C677T		16	23,15	1,83

Table 30 Reprodutibilidade interinstrumento no ELITE BeGenius

Amostra de painel	Alelo	N	Tm média	%CV Ct
Heterozigótico FII SNP G20210A	Fator II tipo selvagem	16	57,7	0,45
	Fator II mutado	16	65,2	0,13
Heterozigótico FV SNP G1691A	Fator V tipo selvagem	16	54,8	0,16
	Fator V mutado	16	61,6	0,23
Heterozigótico MTHFR SNP C677T	MTHFR tipo selvagem	16	56,2	0,30
	MTHFR mutado	16	65,3	0,17

A reprodutibilidade em associação com o ELITE InGenius e o ELITE BeGenius do Coagulation ELITE MGB Kit apresentou uma variabilidade máxima dos valores IC Ct e Tm alvo como %CV inferior a 5%.

Robustez: Teste de contaminação cruzada

A ausência de contaminação cruzada foi verificada através da análise de 6 réplicas de amostras de sangue total alternadas com 6 réplicas de água de grau biológico molecular com o produto Coagulation ELITE MGB Kit no ELITE InGenius.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 31

Amostras	N	Genótipo			IC
		FII het	MTHFR wt	FV wt	Ct < 26,5
Sangue total colhido em EDTA	30	30/30	30/30	30/30	30/30
Água de qualidade para biologia molecular	30	N/A	N/A	N/A	0/30

O ensaio determina como “Inválida” qualquer amostra de água testada que apresente ausência de contaminação cruzada.

Concordância diagnóstica: confirmação do genótipo da amostra certificada

A concordância diagnóstica deste ensaio, como a capacidade de identificar corretamente o genótipo da amostra certificada, foi avaliada através da análise em associação com o ELITE InGenius.

Os resultados estão resumidos nas tabelas seguintes.

Table 32

Genótipo da amostra: Fator V G1691A	N	WT	Het.	Hom.	Concordância diagnóstica	Concordância diagnóstica total
Tipo selvagem	108	108	0	0	100%	100%
Heterozigótico	57	0	57	0	100%	
Homozigótico mutado	53	0	0	53	100%	

Na discriminação alélica do Fator V SNP loco G1691A, o ensaio devolveu resultados concordantes para todas as amostras testadas. Neste teste, a concordância diagnóstica total para o Fator V SNP loco G1691A foi correspondente a 100%.

Table 33

Genótipo da amostra: Fator II G20210A	N	WT	Het.	Hom.	Concordância diagnóstica	Concordância diagnóstica total
Tipo selvagem	160	160	0	0	100%	100%
Heterozigótico	59	0	59	0	100%	
Homozigótico mutado (simulado)	56	0	0	56	100%	

Na discriminação alélica do Fator II SNP loco G20210A, ensaio devolveu resultados concordantes para todas as amostras testadas. Neste teste, a concordância diagnóstica total para o Fator II loco G20210A foi correspondente a 100%.

Table 34

Genótipo da amostra: MTHFR C677T	N	WT	Het.	Hom.	Concordância diagnóstica	Concordância diagnóstica total
Tipo selvagem	63	63	0	0	100%	100%
Heterozigótico	136	0	136	0	100%	
Homozigótico mutado	19	0	0	19	100%	
Homozigótico mutado (simulado)	36	0	0	36		

Na discriminação alélica do MTHFR SNP loco C677T, ensaio devolveu resultados concordantes para todas as amostras testadas. Neste teste, a concordância diagnóstica total para o MTHFR loco C677T foi correspondente a 100%.

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, os desempenhos diagnósticos do ensaio obtidos em associação com o ELITE InGenius também se aplicam ao ELITE BeGenius.

O valor-limite de Ct do Internal Control (IC Ct) está definido para 26,5 para o ELITE InGenius e o ELITE BeGenius.

NOTE

Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e o instrumento estão registados no Ficheiro técnico do produto "Coagulation ELiTe MGB Kit", FTP RTSD00ING.

12 REFERÊNCIAS

- Voorberg, J. et al. (1994) *The Lancet* 343: 1535 - 1536.
- Baker, R. et al. (1994) *The Lancet* 344: 1162.
- Poort, S. R. et al. (1996) *Blood* 88: 3698 - 3703.
- Kluijtmans L. A. et al. (1996) *Am J Hum Genet* 58: 35 - 41.
- Cattaneo M. et al. (1997) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17: 1662-1666

13 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Use este produto apenas com amostras clínicas de sangue total colhidas em EDTA.

Não existem dados disponíveis relativos aos desempenhos do produto com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: saliva.

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, dos Positive Controls e dos produtos de PCR. A contaminação cruzada causa deteção falsa do alelo alvo.. 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 resultados com deteção falsa para os resultados do alelo alvo.

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 com falta de deteção do alelo alvo 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 (ver [11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO page 20](#)). Neste caso, o resultado podia ser inconclusivo.

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.

Um resultado inválido ou inconclusivo obtido com este produto significa que não é possível detetar com eficácia o ADN genómico da amostra ou as temperaturas de dissociação dos alelos. Neste caso, a análise da amostra tem de ser repetida com um possível atraso na obtenção dos resultados.

Possíveis polimorfismos na região do ADN alvo abrangidos pelos primários do produto e as sondas podem prejudicar a deteção do ADN alvo e originar resultados incorretos.

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

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, existe um risco residual de 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 35

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 7 sessões independentes (3 horas cada no bloco de refrigeração da Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit). Não utilize a PCR Mix durante mais de 3 sessões consecutivas (7 horas no bloco de refrigeração da Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit). Não deixe a PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos. Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Degradação 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 36

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 37

Reação da amostra inválida ou inconclusiva	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição o PCR Mix e da amostra. Verifique os volumes do PCR Mix e da amostra.
Degradação da PCR Mix.	Não use a PCR Mix para mais de 7 sessões independentes (3 horas cada na Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit). Não utilize a PCR Mix durante mais de 3 sessões consecutivas (7 horas no bloco de refrigeração da Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit). Não deixe a PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos. Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Inibição devido a substâncias interferentes na amostra.	Repita a amplificação com uma diluição de 1:2 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR only". Repita a extração com uma diluição 1:2 em água de grau de biologia molecular da amostra numa sessão "Extract + PCR" (Extrair + PCR).
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 38

Curva de dissociação anómala	
Causas possíveis	Soluções
Ausência de um pico definido. Pico definido mas Tm diferente do de outras amostras e do 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 39

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 40

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 PCR Mix.

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 dos Regulamentos IVDR 2017/746/CE relativo a dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*. Certificação emitida pela TÜV Süd Product Service GmbH, Alemanha.

Identificação única do dispositivo



Contém suficiente para "N" testes.



Consultar as instruções de utilização.



Conteúdo.



Manter afastado da luz solar.



Fabricante.

16 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.

17 NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA

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

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

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

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

Appendix A Coagulation 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 **Coagulation ELiTe MGB® Kit** é um dispositivo médico de diagnóstico in vitro que se destina a ser usado por profissionais de saúde como um ensaio de PCR em tempo real dos ácidos nucleicos qualitativos para a discriminação alélica dos seguintes três locos:

- gene do fator V de coagulação, polimorfismo do nucleótido único (SNP) G1691A (Leiden),
- gene do fator II da coagulação, SNP G20210A,
- gene da 5,10-metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), SNP C677T.

em singleplex, duplex (FII e FV) ou triplex (FII, FV e MTHFR) em amostras de ADN genómico humano extraídas 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 sangue total colhidas em EDTA.

O produto está previsto para utilização como auxiliar na avaliação do risco de trombose venosa profunda, em pacientes com suspeita de alterações na coagulação e em risco de trombose venosa profunda.

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

Sequência amplificada

Sequência	Gene	Fluoróforo	Canal
Alvo 1	Fator V, SNP G1691A (Leiden)	AP639	FV
Alvo 2	Fator II, SNP G20210A	FAM	FII
Alvo 3	MTHFR, SNP C677T	AP593	MTHFR
Internal Control	Gene beta globina humana	AP525	IC

Matriz validada

- Sangue total colhido em EDTA

Conteúdo do Kit e produtos relacionados

Coagulation ELITe MGB Kit (RTSD00ING)		Coagulation - ELITe Positive Control (CTRD00ING)	
 X 8		 X 3	
52M PCRMix 8 tubos de 280 µL 12 reações por tubo 96 reações por kit 7 ciclos de congelamento-descongelamento por tubo		52M Positive Control 3 tubos de 160 µL 4 reações por tubo 12 reações por kit 4 ciclos de congelamento-descongelamento por tubo	
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 ELITe InGenius e ELITe BeGenius (ver instruções de utilização ELITe InGenius e ELITe BeGenius)
---	--

Protocolo ELITe InGenius e ELITe BeGenius

- Volume da amostra - Volume de eluição total	200 µL 200 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

Genótipo da amostra: Fator V G1691A	Sensibilidade analítica	Concordância diagnóstica
Tipo selvagem	ADN de 70ng/reação	100%
Heterozigótico	ADN de 70ng/reação	100%
Homozigótico mutado	ADN de 70ng/reação	100%

Genótipo da amostra: Fator II G20210A	Sensibilidade analítica	Concordância diagnóstica
Tipo selvagem	ADN de 70ng/reação	100%
Heterozigótico	ADN de 70ng/reação	100%
Homozigótico mutado	ADN de 70ng/reação	100%

Genótipo da amostra: MTHFR C677T	Sensibilidade analítica	Concordância diagnóstica
Tipo selvagem	ADN de 70ng/reação	100%
Heterozigótico	ADN de 70ng/reação	100%
Homozigótico mutado	ADN de 70ng/reação	100%

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.

Table 41

Amostra	Requisitos de colheita	Condições de transporte/armazenamento			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2 / +8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Sangue Total	EDTA	≤ 3 d	≤ 7 d	≤ 30 d	≤ 1 ano

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

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 os tubos de PCR Mix . 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: "200 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: 52M ELITe_WB_200_200 52M ELITe_FII_WB_200_200 52M ELITe_FV_WB_200_200 52M ELITe_MTHFR_WB_200_200 52M ELITe_FVFI_WB_200_200	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. 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

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", eluato: "200 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: 52M ELITe_PC ou 52M ELITe_NC ou 52M ELITe_WB_200_200 52M ELITe_FII_WB_200_200 52M ELITe_FV_WB_200_200 52M ELITe_MTHFR_WB_200_200 52M ELITe_FVFII_WB_200_200	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 rack de Elution tube (Tubo de eluição) com o ácido nucleico extraído	8. Feche a porta. Iniciar a execução	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). <u>Nota:</u> Ambos devem ter sido executados, aprovados e não ter expirado.	3. Descongele os tubos de PCR Mix . 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: "200 µL"
4. Selecione o "Assay protocol" (Protocolo de ensaio) de interesse: 52M ELiTe_Be_WB_200_200 52M ELiTe_FII_Be_WB_200_200 52M ELiTe_FV_Be_WB_200_200 52M ELiTe_MTHFR_Be_WB_200_200 52M ELiTe_FVFI_Be_WB_200_200 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" (Suporte de PCR) com a PCR Cassette e o "Extraction Basket" (Cesto 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 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 expiração) 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: 52M ELiTe_Be_PC ou 52M ELiTe_Be_NC ou 52M ELiTe_Be_WB_200_200 52M ELiTe_FII_Be_WB_200_200 52M ELiTe_FV_Be_WB_200_200 52M ELiTe_MTHFR_Be_WB_200_200 52M ELiTe_FVFI_Be_WB_200_200	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