

NOTICE of CHANGE dated 22/12/2022

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«EBV ELITe MGB Kit»

Ref. RTS020PLD

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

- *Description of IC cut off value already adopted in the Assay protocol of the product (section “Diagnostic specificity: confirmation of negative samples”)*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE

	LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT
	THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT
	CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT
	LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT
	A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT
	DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto «Kit EBV ELITe MGB®» faz parte de um ensaio qualitativo e quantitativo da amplificação de ácidos nucleicos para a **deteção e quantificação do ADN de herpesvírus Epstein–Barr (BKV) humano** em amostras de ADN extraídas de plasma colhido em EDTA e do líquido cefalorraquidiano (CSF).

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

PRINCÍPIOS DO ENSAIO

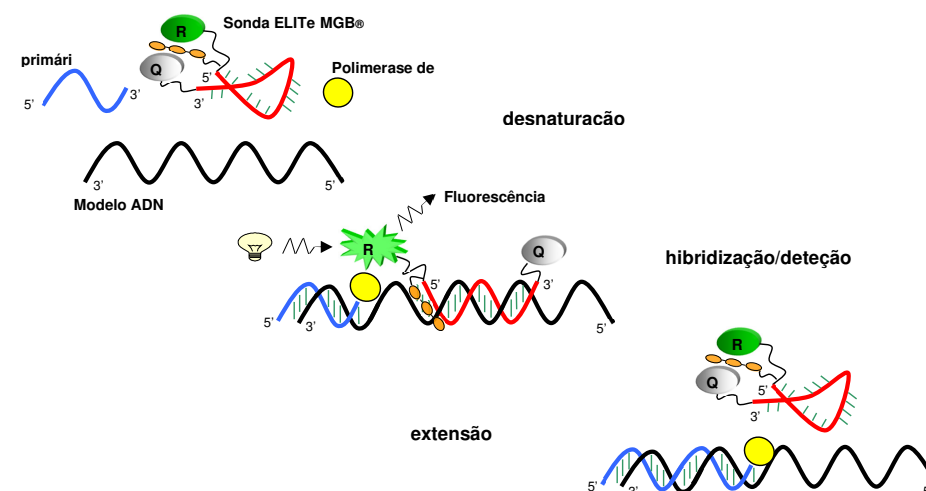
O ensaio consiste numa reação de amplificação em tempo real com um termóstato programável fornecido com um sistema ótico de deteção de fluorescência.

Em cada furo, são realizadas duas reações de amplificação a partir do ADN extraído das amostras a serem testadas: uma reação específica para uma região do **gene EBNA-1** do genoma EBV e uma reação específica para uma região do **gene da betaglobina humana** (Controlo Interno da inibição). A sonda específica do EBV ELITe MGB®, etiquetada com fluoróforo FAM, é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação do EBV. A sonda específica do Controlo Interno ELITe MGB®, etiquetada com fluoróforo AP525 (semelhante a VCI), é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação para o Controlo Interno. À medida que o produto específico da reação de amplificação aumenta, a emissão de fluorescência aumenta e é medida e registada pelo instrumento. O processamento dos dados permite detetar a presença e o título do ADN de EBV na amostra inicial.

No final da sessão de amplificação, pode ser realizada a análise da curva de dissociação (curva de fusão) para determinar a temperatura de dissociação (temperatura de fusão) e para confirmar a presença do alvo correto ou para identificar a presença de mutações.

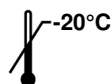
O ensaio é validado com os sistemas descritos nestas instruções de utilização.

Na imagem seguinte é resumidamente mostrado o mecanismo de ativação e a emissão de fluorescência da sonda ELITe MGB®. Tenha em atenção que a sonda não é hidrolisada durante o ciclo de amplificação, pelo que pode ser usada para a análise da curva de dissociação.



EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS020PLD



ÍNDICE

UTILIZAÇÃO PREVISTA

PRINCÍPIOS DO ENSAIO

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

AVISOS E PRECAUÇÕES

ELITE INGENIUS® E ELITe BEGENIUS®

AMOSTRAS E CONTROLOS

PROCEDIMENTO DO ELITE INGENIUS®

PROCEDIMENTO DO ELITE BEGENIUS®

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

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

AMOSTRAS E CONTROLOS

PROCEDIMENTO

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Roche cobas z 480 analyzer

AMOSTRAS E CONTROLOS

PROCEDIMENTO

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

REFERÊNCIAS

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

SÍMBOLOS

NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA

página 2

página 2

página 3

página 3

página 3

página 3

página 5

página 7

página 7

página 8

página 16

página 21

página 34

página 34

página 36

página 47

página 58

página 58

página 59

página 64

página 69

página 69

página 70

página 72

página 73

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto «**Kit EBV ELITE MGB®**» fornece a mistura completa **pronta a usar** Mistura "EBV Q - PCR Mix" para amplificação em tempo real numa solução de estabilização, **aliquotada em quatro tubos de teste descartáveis**. Cada tubo contém **540 µL** de solução, suficiente para **24 testes** (processamento pelo menos 2 amostras por sessão) em associação com os sistemas «**ELITE InGenius®**» e «**ELITE BeGenius®**», e **25 testes** em associação com outros sistemas.

Os primários e a sonda específica do EBV (estabilizado pelo grupo MGB®, etiquetado com fluoróforo FAM e extinto por uma molécula não fluorescente) são específicos para uma região do **gene EBNA-1** do EBV.

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

A mistura de reação fornece tampão, cloreto de magnésio, trifosfatos nucleótidos, fluoróforo AP593, usado em vez de ROX ou Cy5 como referência passiva para normalização da fluorescência, a enzima Uracil-N-glicosidase (UNG) para inativar a contaminação pelo produto de amplificação, a enzima de polimerase de ADN de "arranque a quente".

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

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

MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

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

MATERIAIS NECESSARIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

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

OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

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

Para a extração de ADN manual das amostras a serem analisadas, é validada a utilização dos produtos genéricos «**EXTRAblood**» (ELITechGroup S.p.A., ref. EXTB01), kit para a extração de ADN de amostras celulares e não celulares.

Para uma análise automática da amostra com o instrumento «**ELITE InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) são necessários os seguintes produtos genéricos: o cartucho de extração «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200) ou «**ELITE InGenius® SP 1000**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT033SP1000), os consumíveis para extração e amplificação de ácidos nucleicos a partir de amostras biológicas «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032CS), «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., ref. F2102-000), «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT035PCR) e «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, code TF-350-L-R-S).

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

para os calibradores «**EBV ELITE STD**» ou «**EBV ELITE STD_1000_100**»,
para o controlo positivo da amplificação «**EBV ELITE_PC**» ou «**EBV ELITE_PC_1000_100**»,
para o controlo negativo da amplificação «**EBV ELITE_NC**» ou «**EBV ELITE_NC_1000_100**»,
para análises de amostras «**EBV ELITE_WB_200_100**», «**EBV ELITE_PL_200_100**» e «**EBV ELITE_PL_1000_100**».

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

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

para os calibradores «**EBV ELITE_Be STD**»,
para o Positive Control da amplificação «**EBV ELITE_Be_PC**»,
para o Negative Control da amplificação «**EBV ELITE_Be_NC**»,
para análise das amostras «**EBV ELITE_Be_WB_200_100**» e «**EBV ELITE_Be_PL_200_100**».

Para extração de ADN automática das amostras a serem analisadas, é válida a utilização do produto genérico «**ELITE STAR 200 Extraction kit**» (ELITechGroup S.p.A., Ref. INT011EX), kit para extração de ácido nucleico de amostras biológicas, com o instrumento «**ELITE STAR**» (ELITechGroup S.p.A., Ref. INT010).

Para extração de ADN automática e preparação de microplacas para amplificação de amostras a serem analisadas, é validada a utilização do produto genérico «**ELITE GALAXY 300 Extraction Kit**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT021EX), kit para extração de ácido nucleico de amostras biológicas com o instrumento «**ELITE GALAXY**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT020).

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

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

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

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

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

Quando for usado um Sistema de PCR em tempo real 7300, é recomendado usar o produto genérico «Q - PCR Microplates» (ELITechGroup S.p.A., ref. RTSACC01), microplacas com furos de 0,2 mL e folhas vedantes adesivas para amplificação em tempo real.

Quando for usado um 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, é recomendado o uso do produto genérico: «Q - PCR Microplates Fast» (ELITechGroup S.p.A., ref. RTSACC02), microplacas com furos de 0,1 mL e folhas vedantes adesivas para amplificação em tempo real.

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

Se for necessária a deteção de ADN de EBV (análise qualitativa), use o produto «Controlo positivo EBV - ELITe» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR020PLD) ou o produto «RF de controlo positivo EBV - ELITe» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR020PLD-R), específico para utilização com cobas z 480 analyzer, positive control de ADN de plasmídeo.

Se for necessária a deteção e quantificação de ADN de EBV (análise quantitativa), use o produto «EBV ELITe Standard» (ELITechGroup S.p.A., ref. STD020PLD), quatro diluições de ADN de plasmídeo de quantidade conhecida para obter a curva standard.

Um fator de conversão permite exprimir os resultados da análise quantitativa em Unidades Internacionais do EBV da "1.ª Norma Internacional da OMS para vírus Epstein-Barr humano para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC ref. 09/260, Reino Unido).

AVISOS E PRECAUÇÕES

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

Avisos e precauções gerais

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

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

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

Nunca deve pipetar soluções com a boca.

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

Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.

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

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

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

Não utilize o produto após a data de validade indicada.

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

Não use reagentes de lotes diferentes.

Não use reagentes de outros fabricantes.

Avisos e precauções para biologia molecular

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

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

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

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

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

Os produtos de extração devem ser manuseados de modo a reduzir, tanto quanto possível, a dispersão para o ambiente, para evitar a possibilidade de contaminação. As pipetas usadas no manuseamento de 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 um exaustor de fluxo de ar laminar. Os reagentes necessários para a amplificação devem ser preparados de forma a que possam ser usados numa sessão única. As pipetas usadas no manuseamento dos reagentes devem ser usadas exclusivamente para este fim. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

Os produtos de amplificação devem ser manuseados de modo a reduzir, tanto quanto possível, a dispersão para o ambiente, para evitar a possibilidade de contaminação.

Avisos e precauções específicos para os componentes

A EBV Q - PCR Mix deve ser guardada a uma temperatura inferior a -20 °C num local escuro.

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

ELITe InGenius® e ELITe BeGenius®

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

O produto deve ser utilizado com as seguintes amostras clínicas:

Sangue completo colhido em EDTA

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

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

Nota: quando a extração de ADN de sangue completo for realizada com o **ELITe InGenius** e com o **Software ELITe InGenius** versão **1.3** (ou versões equivalentes mais recentes), use o protocolo de extração **EBV ELITe _WB_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o **CPE Internal Control** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL da água.

Nota: quando a extração de ADN de sangue completo for realizada com o **ELITe BeGenius** e com o **Software ELITe BeGenius** versão **2.0** (ou versões equivalentes mais recentes), use o protocolo de extração **EBV ELITe _Be_WB_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o **CPE Internal Control** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

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

Plasma colhido em EDTA

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

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

Nota: quando a extração de ADN de 200 µL de plasma for realizada com o **ELITe InGenius** e com o **Software ELITe InGenius** versão **1.3** (ou versões equivalentes mais recentes), use o protocolo de extração **EBV ELITe _PL_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o **Controlo interno CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL da água.

Nota: quando a extração de ADN a partir de 200 µL de plasma for realizada com o **ELITe BeGenius** e **ELITe BeGenius Software** versão **2.0** (ou versões posteriores equivalentes), utilize o protocolo de extração **EBV ELITe _Be_PL_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o **CPE Internal Control** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

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

Nota: quando a extração de ADN de 1000 µL de plasma for realizada com o **ELITe InGenius** e com o **Software ELITe InGenius** versão **1.3** (ou versões equivalentes mais recentes), use o protocolo de extração **EBV ELITe _PL_1000_100**. Este protocolo processa 1000 µL de amostra, adiciona o **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

O tubo primário não pode ser usado em associação com o protocolo de ensaio **EBV ELITe _PL_1000_100**.

Substâncias interferentes

Os dados disponíveis relativos à inibição causada por fármacos e outras substâncias são comunicados no parágrafo "Potenciais substâncias interferentes" do capítulo "Características de desempenho".

Não use sangue completo ou plasma colhido em heparina para evitar a inibição da reação de amplificação e resultados inválidos frequentes.

Calibradores da amplificação e controlos da amplificação

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

como definição do calibrador, utilize os quatro níveis de concentração do **EBV ELITe Standard**, em associação com o protocolo «**EBV ELITe _STD**» ou «**EBV ELITe _STD_1000_100**» e «**EBV ELITe _Be _STD**» para **ELITe BeGenius**,

como Controlo positivo da amplificação use o **EBV - ELITe Positive Control**, em associação com o protocolo «**EBV ELITe _PC**» ou «**EBV ELITe _PC_1000_100**» para **ELITe InGenius**, e «**EBV ELITe _Be _PC**» para **ELITe BeGenius**,

como Controlo negativo da amplificação, use água de qualidade para biologia molecular (não fornecida com este kit) em associação com o protocolo «**EBV ELITe _NC**» ou «**EBV ELITe _NC_1000_100**» para o **ELITe InGenius** e «**EBV ELITe _Be _NC**» para o **ELITe BeGenius**.

Nota: o **ELITe InGenius** com **ELITe InGenius Software** e o **ELITe BeGenius** com **ELITe BeGenius Software** permite a criação da curva de calibração e a validação dos Controlos da amplificação para cada lote do reagente da amplificação a ser guardado na respetiva base de dados.

As curvas da calibração, aprovadas e guardadas na base de dados, irão expirar após **60 dias**. Na data de expiração será necessário voltar a executar a definição do calibrador.

Os resultados do controlo de validação da amplificação, aprovados e guardados na base de dados, irão expirar após **15 dias**. Na data de expiração será necessário voltar a executar os Controlos positivo e negativo.

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

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

Controlos da qualidade

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

PROCEDIMENTO do ELITe InGenius®

O procedimento para utilização do «**EBV - ELITe MGB® Kit**» com o sistema **ELITe InGenius** consiste em três passos:

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

Verificação da prontidão do sistema

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

- ligar o **ELITe InGenius** e selecionar o modo «**CLOSED**» (Fechado);
- verificar se os Calibradores (Calibração - **EBV Q - PCR Standard**) são executados, aprovados e não expirados (estado). Pode verificar esta situação no menu "Calibração" na página inicial;
- verificar se os Controlos da amplificação (**EBV Positive Control**, Controlo negativo ADV) são executados, aprovados e não expirados (estado). Pode verificar esta situação no menu "Controlo" na página inicial;

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

- escolher o tipo de execução e preparar a mesma, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pelo ELITechGroup. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os kits ELITe MGB e o instrumento ELITe InGenius e instrumento **ELITe InGenius** e a matriz citada.

Os Protocolos de ensaio disponíveis para o **EBV ELITe MGB® Kit** estão descritos na tabela seguinte.

Protocolos de ensaio para o EBV ELITe MGB® kit e o ELITe InGenius			
Nome	Matriz	Unidade do relatório	Características
EBV ELITe_WB_200_100	Sangue completo	Cópias/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo interno: 10 µL Sonicacão: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada PCR de amostra: 20 µL
EBV ELITe_PL_200_100	Plasma	Cópias/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo interno: 10 µL Sonicacão: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada PCR de amostra: 20 µL
EBV ELITe_PL_1000_100	Plasma	Cópias/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 1000 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo interno: 10 µL Sonicacão: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada PCR de amostra: 20 µL

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

Os protocolos para análise qualitativa estão disponíveis a pedido.

Preparação da sessão

O Kit **EBV ELITe MGB®** em associação com o **ELITe InGenius** pode ser usado para:

- Execução integrada (Extract + PCR),
- Execução de amplificação (PCR only),
- Execução da calibração (PCR only),
- Execução de Controlo positivo e/ou positivo da amplificação (apenas PCR)

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

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

Estão descritas a seguir as operações principais para definir os quatro tipos de deslocação.

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

A. Execução integrada

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

- Descongele um número suficiente de tubos da EBV Q - PCR Mix para a sessão. Cada tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Descongele um número suficiente de tubos CPE para a sessão. Cada tubo é suficiente para 12 extrações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
- Selecione o volume de entrada da extração: 200 µL para processar 200 µL da amostra ou 1000 µL para processar 1000 µL da amostra e certifique-se de que o Volume de eluição extraído é 100 µL.
- Para cada Rastreo de interesse preencha a "SampleID" (SID) digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
- Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (isto é, EBV ELITe_WB_200_100).
- Certifique-se de que o "Protocol" apresentado é: "Extract + PCR".
- Selecione a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position":
 - se for usado um tubo primário, selecione "Tubo primário". O Tubo primário apenas pode ser usado a partir de amostras de 200 µL;
 - se for usado um tubo secundário, selecione "Tubo de extração".
 Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a CPE e a Mistura EBV Q-PCR no Bloco de inventário selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue e verifique os Suportes de pontas na Área de inventário selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a "PCR Cassette", os cartuchos de extração "ELITe InGenius SP 200" ou "ELITe InGenius SP1000", todos os consumíveis necessários e as amostras a serem extraídas nas posições especificadas no passo 8, seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

Nota: A PCR mix pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de **16 horas** no total (máximo de 5 sessões ou 1 sessão noturna seguida de apenas 1 configuração).

B. Execução da amplificação

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

1. Descongele um número suficiente de tubos da EBV Q - PCR Mix para a sessão. Cada tubo é suficiente para 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
3. Mesmo que a extração não seja realizada, selecione o volume de entrada da extração: 200 µL para processar 200 µL da amostra ou 1000 µL para processar 200 µL da amostra e certifique-se de que o Volume de eluição extraído é 100 µL.
4. Para cada Rastreo de interesse introduza a "SampleID" (SID) digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
5. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (isto é, EBV ELITe _WB_200_100).
6. Selecione "PCR Only" na coluna "Protocol".
7. Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" é "Elution Tube (linha inferior)". Clique em "Next" para continuar a preparação.
8. Carregue a Mistura EBV Q-PCR no "Bloco de inventário" selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue e verifique os Suportes de pontas na Área de inventário selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue as "PCR Cassette" e as amostras de Ácido nucleico extraídas seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
11. Feche a porta do instrumento.
12. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

Nota: A PCR mix pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de **16 horas** no total (máximo de 5 sessões ou 1 sessão noturna seguida de apenas 1 configuração).

C. Execução de calibração

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

1. Descongele um número suficiente de tubos da EBV Q - PCR Mix para a sessão. Cada tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Descongele os tubos EBV Q - PCR Standard (Cal1: EBV Q-PCR Standards 10², Cal2: EBV Q-PCR Standards 10³, Cal3: EBV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: EBV Q-PCR Standards 10⁵). Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
4. Mesmo que a extração não seja realizada, selecione o volume de entrada da extração: 200 µL para processar 200 µL da amostra ou 1000 µL para processar 1000 µL da amostra e certifique-se de que o Volume de eluição extraído é 100 µL.
5. Começando a partir do Rastreo de interesse, selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (EBV ELITe STD ou EBV ELITe STD_1000_100) e preencha com o número do lote e a data de expiração para o EBV Q - PCR Standard. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
6. Carregue a Mistura EBV Q-PCR no "Bloco de inventário" selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
7. Carregue/verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
8. Carregue os tubos do Calibrador e "PCR Cassettes", seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação. Tenha o cuidado de carregar os fluidos PCR Standard nos rastreios corretos como indicado na GUI.
9. Feche a porta do instrumento.
10. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

Nota: A PCR mix pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de **16 horas** no total (máximo de 5 sessões ou 1 sessão noturna seguida de apenas 1 configuração).

D. Execução de amplificação para Positive Control e Negative Control

Para preparar a execução de Controlo positivo e Controlo negativo da amplificação, efetue os passos a seguir em conformidade com a GUI:

1. Descongele um número suficiente de tubos da EBV Q - PCR Mix para a sessão. Cada tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Descongele o produto EBV - ELITe Positive Control, para amplificação de Controlo positivo. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Transfira pelo menos 50 µL da água de qualidade para biologia molecular para as sessões num tubo Eluição, fornecido com o ELITe InGenius SP Consumable Set.
4. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
5. Mesmo que a extração não seja realizada, selecione o volume de entrada da extração: 200 µL para processar 200 µL da amostra ou 1000 µL para processar 1000 µL da amostra e certifique-se de que o Volume de eluição extraído é 100 µL.
6. Para o controlo positivo, selecione EBV ELITe_PC ou EBV ELITe_PC_1000_100 e preencha o número do lote e a data de validade do EBV Positive Control.
7. Para o controlo negativo, selecione EBV ELITe_NC ou EBV ELITe_NC_1000_100 e preencha o número do lote e a data de validade da água de qualidade para biologia molecular.
8. Clique em "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue a Mistura EBV Q-PCR no "Bloco de inventário" selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue e verifique os Suportes de pontas na Área de inventário selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue as PCR Cassette da amplificação, o Positive Control e/ou o Negative Control, seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
12. Feche a porta do instrumento.
13. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

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

Nota: A PCR mix pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de **16 horas** no total (máximo de 5 sessões ou 1 sessão noturna seguida de apenas 1 configuração).

Revisão e aprovação de resultados

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

Nota: Para obter informações mais detalhadas, consulte o manual do utilizador do instrumento **ELITe InGenius**.

O **ELITe InGenius** gera os resultados utilizando o **Kit EBV ELITe MGB®** através do seguinte procedimento:

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

A. Validação da Curva de calibração

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda EBV específica ("EBV") nas reações de amplificação do Calibrador são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos no protocolo de ensaio "EBV ELITe_STD" e "EBV ELITe_STD_1000_100".

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

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

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

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

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

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

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda específica EBV ("EBV") nas reações de amplificação de Controlo positivo e Controlo negativo são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos nos protocolos de ensaio "EBV ELITe_PC", "EBV ELITe_PC_1000_100", "EBV ELITe_NC" e "EBV ELITe_NC_1000_100".

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

Os resultados do Controlo positivo da amplificação, específicos para o lote de reagente de amplificação, irão expirar após 15 dias.

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

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

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

C. Validação dos resultados das amostras

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

Nota: Antes da análise de qualquer amostra, é absolutamente obrigatório criar e aprovar a Curva de calibração e os Controlos de amplificação para o lote do reagente usado. É recomendado, mas opcional, executar o Controlo positivo e negativo em conjunto com os Calibradores. A disponibilidade de resultados da Curva de calibração e de Positive e Negative Control da amplificação com "Approved" (Estado) é mostrada nas janelas "Calibration" e "Controls" do software ELITe InGenius, sendo comunicada na secção "Assay Parameters".

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

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

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

Para cada amostra, o resultado do ensaio é automaticamente interpretado pelo sistema como estabelecido pelo algoritmo **ELITe InGenius Software** e os parâmetros do Protocolo do ensaio.

O sistema efetua automaticamente o cálculo da carga viral para cada amostra. A medição exprime-se em "cópias/mL" ou "IU/mL", conforme definido no protocolo do ensaio.

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

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

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

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

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

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

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

D. Elaboração do relatório do resultado das amostras

Os resultados da amostra são guardados na base de dados e podem ser visualizados como "Relatório da amostra" e "Relatório do rastreio".

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

O "Relatório do rastreio" apresenta os detalhes de uma execução da amostra, rastreio a rastreio.

O "Sample Report" e o "Track Report" podem ser impressos e assinados por pessoal autorizado.

PROCEDIMENTO do ELITe BeGenius®

O procedimento para utilização do «**EBV ELITe MGB® Kit**» com o sistema **ELITe BeGenius** consiste em três passos:

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

Verificação da prontidão do sistema

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

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

Os Protocolos de ensaio disponíveis para o «Kit EBV ELITe MGB®» estão descritos na tabela seguinte.

Protocolos de ensaio para o «EBV ELITe MGB Kit» e o ELITe InGenius			
Nome	Matriz	Unidade do relatório	Características
EBV ELITe_Be_WB_200_100	Sangue completo	cópias/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo interno: 10 µL Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada PCR de amostra: 20 µL
EBV ELITe_Be_PL_200_100	Plasma	cópias/mL ou IU/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo interno: 10 µL Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada PCR de amostra: 20 µL

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

Estão disponíveis mediante pedido os protocolos do ensaio qualitativo.

Preparação da sessão

O EBV ELITe MGB Kit em associação com o ELITe BeGenius pode ser usado para:

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

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

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

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

A. Execução da amostra

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

- Descongele um número suficiente de tubos da EBV Q - PCR Mix para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Descongele um número suficiente de tubos CPE para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para 12 extrações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
- Retire os Suportes da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
- Selecione o "run mode": "Extract + PCR".
- Carregue as amostras na área de refrigeração a partir do Suporte de amostras L5.
- Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.

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

- Verifique o Volume de entrada de extração (200 µL) e o Volume de eluição extraído (100 µL).
- Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (isto é, EBV ELITe_Be_WB_200_100). Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Se for realizada uma segunda extração, repita os passos 6 a 9 utilizando o suporte de amostras L4.
- Carregue os tubos de eluição com código de barras na área de refrigeração, a partir do suporte de eluição L3.

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

- Insira o suporte de eluição L3 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Repita os passos 11 e 12 utilizando o Suporte de reagente/eluição L2.
- Carregue o CPE e a EBV Q-PCR Mix na área de refrigeração.
- Insira o suporte de reagente L1 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue e verifique os Suportes de pontas na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue o Suporte de PCR com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue o Suporte de extração com os cartuchos de extração "ELITe InGenius SP 200" e os consumíveis de extração necessários seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

Nota: A PCR Mix pode ser utilizada para 7 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

B. Execução da amplificação

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

1. Descongele um número suficiente de tubos da EBV Q - PCR Mix para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
3. Retire os Suportes 1, 2 e 3 da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
4. Selecione o "run mode": "PCR Only".
5. Carregue as amostras na área de refrigeração a partir do Suporte de eluição L3.
6. Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
7. Mesmo que não seja efetuada a extração, verifique o Volume de entrada de extração (200 µL) e o Volume de eluição extraído (100 µL).
8. Selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (por ex., EBV ELITe_Be_WB_200_100). Clique em "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue a EBV Q-PCR Mix na área de refrigeração.
10. Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue e verifique os Suportes de pontas na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
12. Carregue o Suporte de PCR com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
13. Feche a porta do instrumento.
14. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

Nota: A PCR Mix pode ser utilizada para 7 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

C. Execução de calibração

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

1. Descongele um número suficiente de tubos da EBV Q - PCR Mix para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Descongele os tubos EBV Q - PCR Standard (Cal1: EBV Q-PCR Standards 10², Cal2: EBV Q-PCR Standards 10³, Cal3: EBV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: EBV Q-PCR Standards 10⁵). Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
4. Retire os Suportes 1, 2 e 3 da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.

5. Selecione o "run mode": "PCR Only".
6. Carregue os tubos do Calibrador no Suporte de eluição L3.
7. Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
8. Mesmo que não seja efetuada a extração, verifique o Volume de entrada de extração (200 µL) e o Volume de eluição extraído (100 µL).
9. Selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (EBV ELITe_Be_STD). Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue a EBV Q-PCR Mix no Suporte de reagente/eluição L2.
11. Insira o Suporte de reagente/eluição L2 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
12. Carregue e verifique os Suportes de pontas na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
13. Carregue o Suporte de PCR com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
14. Feche a porta do instrumento.
15. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

Nota: A PCR Mix pode ser utilizada para 7 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

D. Execução de Controlo positivo e Controlo negativo

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

1. Descongele um número suficiente de tubos da EBV Q - PCR Mix para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Descongele o produto EBV - ELITe Positive Control, para amplificação de Controlo positivo. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Transfira pelo menos 50 µL da água de qualidade para biologia molecular (como Negative Control) para as sessões num tubo Eluição, fornecido com o ELITe InGenius SP Consumable Set.
4. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
5. Retire os Suportes 1, 2 e 3 da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
6. Selecione o "run mode": "PCR Only".
7. Carregue os tubos de Positive Control e Negative Control no Suporte de eluição L3.
8. Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
9. Mesmo que não seja efetuada a extração, verifique o Volume de entrada de extração (200 µL) e o Volume de eluição extraído (100 µL).

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

10. Selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (por ex., (EBV ELITe_Be_PC e EBV ELITe_Be_NC). Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue a EBV Q-PCR Mix no Suporte de reagente/eluição L2.
12. Insira o Suporte de reagente/eluição L2 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
13. Carregue e verifique os Suportes de pontas na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
14. Carregue o Suporte de PCR com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
15. Feche a porta do instrumento.
16. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

Nota: A PCR Mix pode ser utilizada para 7 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

Revisão e aprovação de resultados

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

O **ELITe BeGenius** gera os resultados utilizando o EBV ELITe MGB Kit através do seguinte procedimento:

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

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

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade analítica: Limite de deteção

A sensibilidade analítica deste ensaio usado como Limite de Deteção (LoD), em associação com amostras de sangue completo e do plasma colhidas em EDTA e o **ELITe InGenius** foi verificada com um painel de diluições de EBV dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da "1.^a norma internacional da OMS para vírus Epstein-Barr (EBV) para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/260, Reino Unido) em ADN EBV - matriz negativa. O painel era constituído por, pelo menos, seis pontos à volta da concentração limite. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas realizando todo o procedimento de análise, preparação da execução, extração de ácidos nucleicos, amplificação em tempo real e interpretação de dados com o **ELITe InGenius** e produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

Os resultados finais são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção com o ELITe InGenius (IU/mL)				
Volume da amostra	Matriz	LoD	intervalo de 95% de confiança	
			limite inferior	limite superior
200 µL	Sangue completo	104 IU/mL	75 IU/mL	175 IU/mL
	Plasma	124 IU/mL	77 IU/mL	290 IU/mL
1000 µL	Plasma	18 IU/mL	13 IU/mL	28 IU/mL

A sensibilidade analítica como cópias / mL para cada matriz e o **ELITe InGenius** é calculada através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 30.

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

Limite de deteção com o ELITe InGenius (cópias/mL)				
Volume da amostra	Matriz	LoD	intervalo de 95% de confiança	
			limite inferior	limite superior
200 µL	Sangue completo	36 cópias/mL	26 cópias/mL	60 cópias/mL
	Plasma	65 cópias/mL	41 cópias/mL	153 cópias/mL
1000 µL	Plasma	11 cópias/mL	8 cópias/mL	18 cópias/mL

O valor LoD calculado foi verificado no **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** através de testes a 20 réplicas de sangue completo colhido em EDTA e 20 réplicas de Plasma colhido em amostras EDTA reforçadas por material de referência certificado EBV (1.^a Norma internacional da OMS, NIBSC) a uma concentração reivindicada. O LoD é confirmado se, pelo menos, 18 em 20 réplicas derem resultado positivo em conformidade com a norma CLSI EP17-A.

Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de sangue completo e plasma e o ELITe InGenius					
Amostra	Título	Alvo	N	Positivo	Negativo
Sangue completo colhido em EDTA	104 IU/mL	EBV	20	20	0
Plasma colhido em EDTA	124 IU/mL	EBV	20	20	0

Limite de deteção para amostras de sangue completo e plasma e o ELITe BeGenius					
Amostra	Título	Alvo	N	Positivo	Negativo
Sangue completo colhido em EDTA	104 IU/mL	EBV	20	19	1
Plasma colhido em EDTA	124 IU/mL	EBV	20	20	0

O valor do LoD para o alvo EBV foi confirmado a 104 IU/mL para sangue completo colhido em EDTA, a 124 IU/mL para plasma colhido em EDTA.

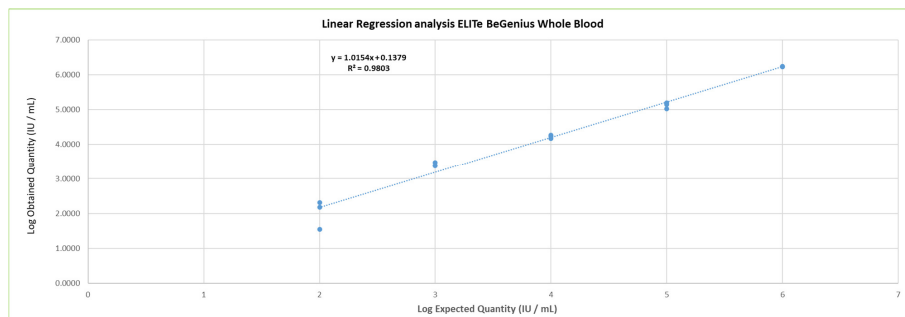
Intervalo de medição linear e Limites de quantificação

O intervalo de medição linear do EBV ELITe MGB® Kit usado em associação com Sangue completo e Plasma colhido em EDTA (volume de amostra 200 µL) e os **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** foi verificado com um painel de diluições de EBV. O painel foi preparado através da diluição da "1.^a norma internacional da OMS para vírus Epstein-Barr (EBV) para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/260, Reino Unido) em ADN EBV - matriz negativa. O painel era constituído por cinco pontos de diluição (passos de diluição de 1 Registro10) a partir de 10⁶ IU/mL a 10² IU/mL. Cada amostra do painel foi testada em 3 réplicas. A análise dos dados obtidos, realizada por regressão linear, demonstrou que o ensaio mostra uma resposta linear para todos os níveis de diluição.

Para sangue completo:

A análise dos dados obtidos, realizada por análise da regressão linear, demonstrou que o ensaio, em associação com amostras de sangue completo, mostra uma resposta linear para todas as diluições com um coeficiente de correlação quadrado (R²) igual a 0,999 para o **ELITe InGenius** e 0,980 para o **ELITe BeGenius**.

Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.



O Limite inferior de quantificação (LLoQ) foi definido a 104 IU / mL, a concentração LoD, que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,2968 Registro IU/mL para o **ELITe InGenius** e 0,2486 Registro IU/mL para o **ELITe BeGenius**) e exatos (Bias igual a 0,4035 Registro IU/mL para o **ELITe InGenius** e 0,1329 Registro IU/mL para o **ELITe BeGenius**):

O Limite superior de quantificação (ULoQ) foi definido à concentração de 1,000,001 IU /mL, a mais alta testada que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,0299 Registro IU/mL para o **ELITe InGenius** e 0,0079 Registro IU/mL para o **ELITe BeGenius**) e exatos (Bias igual a 0,3459 Registro IU/mL para o **ELITe InGenius** e 0,2311 Registro IU/mL para o **ELITe BeGenius**):

O intervalo de medição linear como cópias/mL para sangue completo é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 30.

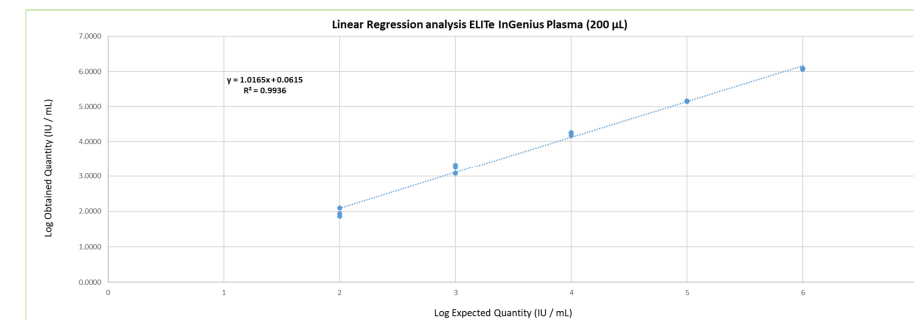
Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear para amostras de sangue completo e o ELITe InGenius e ELITe BeGenius			
Volume da amostra	Unidade de medida	limite inferior	limite superior
200 µL	IU/mL	104	1,000,001
	cópias/mL	36	344,828

Para o plasma (volume da amostra de 200 µL):

A análise dos dados obtidos, realizada por análise da regressão linear, demonstrou que o ensaio, em associação com amostras de Plasma colhido em EDTA, mostra uma resposta linear para todas as diluições com um coeficiente de correlação quadrado (R²) igual a 0,994 para o **ELITe InGenius** e 0,981 para o **ELITe BeGenius**.

Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.



O Limite inferior de quantificação (LLoQ) foi definido à concentração do LoD que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão = 0,2728 Registro IU/mL para o **ELITe InGenius** e Desvio padrão = 0,3457 Registro IU/mL para o **ELITe BeGenius**) e exatos (Bias = 0,0556 Registro IU/mL para o **ELITe InGenius** e Bias = 0,1089 Registro IU/mL para o **ELITe BeGenius**) dentro de ±0,5 Registro IU/mL: 124 IU/mL.

O Limite superior de quantificação (ULoQ) foi definido à concentração mais alta que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão = 0,0154 Registro IU/mL para o **ELITe InGenius** e Desvio Padrão = 0,0252 Registro IU/mL para o **ELITe BeGenius**) e exatos (Bias = 0,0761 Registro IU/mL para o **ELITe InGenius** e Bias = 0,2348 Registro IU/mL para o **ELITe BeGenius**) dentro de ±0,5 Registro IU/mL: 1.000.000 IU/mL.

O intervalo de medição linear como cópias/mL para Plasma colhido em EDTA é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 30.

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

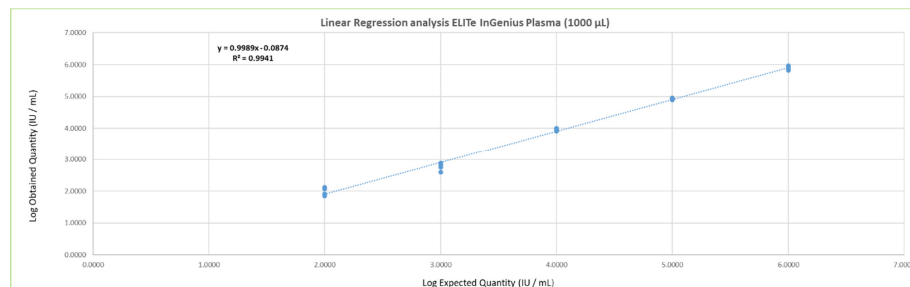
Intervalo de medição linear para amostras de plasma e o ELITe InGenius e ELITe BeGenius (200 µL)		
Unidade de medida	limite inferior	limite superior
IU/mL	124	1.000.000
cópias/mL	65	526.316

Para o plasma (volume da amostra de 1000 µL):

O intervalo de medição linear do EBV ELITe MGB® Kit usado em associação com Plasma colhido em EDTA (volume de amostra 1000 µL) e os **ELITe InGenius** foi verificado com um painel de diluições de EBV. O painel foi preparado através da diluição da "1.^a norma internacional da OMS para vírus Epstein-Barr (EBV) para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/260, Reino Unido) em ADN EBV - matriz negativa. O painel era constituído por cinco pontos de diluição (passos de diluição de 1 Registo10) a partir de 10⁶ IU/mL a 10² IU/mL. Cada amostra do painel foi testada em 3 réplicas. A análise dos dados obtidos, realizada por regressão linear, demonstrou que o ensaio mostra uma resposta linear para todos os níveis de diluição.

A análise dos dados obtidos, realizada por análise da regressão linear, demonstrou que o ensaio, em associação com amostras de Plasma (volume da amostra 1000 µL), mostra uma resposta linear para todas as diluições com um coeficiente de correlação quadrado (R²) igual a 0,994 para o **ELITe InGenius**.

Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.



O Limite inferior de quantificação (LLOQ) foi definido à concentração inferior que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio standard = registo 0,126 IU/mL para o **ELITe InGenius**) e exatos (Bias = registo -0,015 IU/mL para o **ELITe InGenius**) dentro do registo ±0,5 IU/mL: 99 IU/mL.

O Limite superior de quantificação (ULOQ) foi definido à concentração mais alta que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio standard = registo 0,064 IU/mL para o **ELITe InGenius**) e exatos (Bias = registo -0,102 IU/mL para o **ELITe InGenius**) dentro do registo ±0,5 IU/mL: 1.000.000 IU/mL.

O intervalo de medição linear como cópias/mL para Plasma colhido em EDTA é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 30.

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear para amostras de plasma e o ELITe InGenius (1000 µL)			
Volume da amostra	Unidade de medida	limite inferior	limite superior
1000 µL	IU/mL	99	1.000.000
	cópias/mL	62	625.000

O limite inferior do intervalo de medição linear foi definido à concentração mais baixa a fornecer 100% de positividade e resultados quantitativos suficientemente exatos e precisos.

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

O limite superior do intervalo de medição linear foi definido à concentração mais alta que fornece resultados quantitativos suficientemente exatos e precisos.

O intervalo de medição linear como cópias/mL para cada matriz é calculada através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 30.

Capacidade de repetição

A Capacidade de repetição dos resultados obtidos pelo produto EBV ELITe MGB Kit em associação com os sistemas ELITe InGenius e ELITe BeGenius foi testada através da análise de um painel de amostras de Sangue completo colhido em EDTA. O painel incluiu uma amostra negativa e duas amostras reforçadas com material de referência certificado EBV (1.^a Norma internacional EBV da OMS, NIBSC) a uma concentração de 3 x LoD (cerca de 312 IU/mL) e de 10 x LoD (cerca de 1040 IU/mL).

A Capacidade de repetição intra-sessão no **ELITe InGenius** foi obtida através da análise de amostras do painel em oito réplicas, em duas execuções por dia, com o mesmo lote do produto, no mesmo instrumento, pelo mesmo operador, no mesmo dia. As amostras foram processadas em posições aleatórias.

A Capacidade de repetição inter-sessão no **ELITe InGenius** foi obtida através da análise de amostras do painel em oito réplicas, em duas execuções por dia, com o mesmo lote do produto, no mesmo instrumento, pelo mesmo operador, em dois dias diferentes. As amostras foram processadas em posições aleatórias.

Os valores Ct do alvo e do Controlo Interno foram usados para calcular a %CV para avaliar a Capacidade de repetição como imprecisão.

É mostrado nas tabelas seguintes um resumo dos resultados.

Capacidade de repetição intra-sessão ELiTe InGenius Lote U0521-016								
Amostra	EBV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	23,97	0,38	1,60
3 x LoD	8 / 8	35,68	0,57	1,60				
10 x LoD	8 / 8	34,22	0,24	0,70				

Capacidade de repetição inter-sessão ELiTe InGenius Lote U0521-016								
Amostra	EBV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV
Negativo	0 / 14	N.A.	N.A.	N.A.	46 / 46	24,21	0,46	1,91
3 x LoD	16 / 16	35,72	0,53	1,48				
10 x LoD	16 / 16	34,39	0,37	1,07				

No teste da Capacidade de repetição no **ELITe InGenius**, o ensaio detetou o EBV alvo como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores Ct que não excederam 1,6% para EBV e 1,9% para o Controlo Interno.

A Capacidade de repetição intra-sessão no **ELITe BeGenius** foi obtida através da análise de amostras do painel em oito réplicas, em uma execução por dia, com o mesmo lote do produto, no mesmo instrumento, no mesmo dia. As amostras foram processadas em posições aleatórias.

A Capacidade de repetição inter-sessão no **ELITe BeGenius** foi obtida através da análise de amostras do painel em oito réplicas, em uma execução por dia, com o mesmo lote do produto, no mesmo instrumento, em dois dias diferentes. As amostras foram processadas em posições aleatórias.

Os valores Ct do alvo e do Controlo Interno foram usados para calcular a %CV para avaliar a Capacidade de repetição como imprecisão.

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

REF RTS020PLD

É mostrado nas tabelas seguintes um resumo dos resultados.

Capacidade de repetição intra-sessão ELITE BeGenius Lote U0521-016								
Amostra	EBV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	27,13	0,76	2,80
3 x LoD	8 / 8	37,32	0,49	1,30				
10 x LoD	8 / 8	35,97	0,43	1,19				

Capacidade de repetição inter-sessão ELITE BeGenius Lote U0521-016								
Amostra	EBV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV
Negativo	0 / 14	N.A.	N.A.	N.A.	46 / 46	27,32	0,69	2,53
3 x LoD	16 / 16	37,29	0,67	1,79				
10 x LoD	16 / 16	35,82	0,67	1,86				

No teste da Capacidade de repetição no **ELITE BeGenius**, o ensaio detetou o EBV alvo como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores Ct que não excederam 1,9% para EBV e 2,8% para o Controlo Interno.

Capacidade de reprodução

A Capacidade de reprodução dos resultados obtidos pelo produto EBV ELITE MGB Kit em associação com os sistemas **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** foi testada através da análise de um painel de amostras de sangue completo. O painel incluiu uma amostra negativa e duas amostras reforçadas com material de referência certificado EBV (1.^a Norma internacional EBV da OMS, NIBSC) a uma concentração de 3 x LoD (cerca de 312 IU/mL) e de 10 x LoD (cerca de 1040 IU/mL).

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

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

Os valores Ct do alvo e do Controlo Interno foram usados para calcular a %CV para avaliar a Capacidade de reprodução como imprecisão.

É mostrado na tabela seguinte um resumo dos resultados.

Capacidade de reprodução inter-instrumento ELITE InGenius								
Amostra	EBV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	25,25	0,70	2,77
3 x LoD	8 / 8	35,78	0,44	1,24				
10 x LoD	8 / 8	30,38	0,36	1,17				

Capacidade de repetição inter-lote ELITE InGenius								
Amostra	EBV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	25,25	0,70	2,77
3 x LoD	8 / 8	35,91	0,38	1,06				
10 x LoD	8 / 8	34,48	0,15	0,43				

No teste da Capacidade de reprodução no **ELITE InGenius**, o ensaio detetou o EBV alvo como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores Ct que não excederam 1,24% para EBV e 2,77% para o Controlo Interno.

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

REF RTS020PLD

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

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

Os valores Ct do alvo e do Controlo Interno foram usados para calcular a %CV para avaliar a Capacidade de reprodução como imprecisão.

É mostrado na tabela seguinte um resumo dos resultados.

Capacidade de repetição inter-instrumento ELITE BeGenius								
Amostra	EBV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV
Negativo	0 / 7	N.A.	N.A.	N.A.	23 / 23	28,39	0,61	2,14
3 x LoD	8 / 8	36,79	0,86	2,32				
10 x LoD	8 / 8	35,15	0,65	1,84				

Capacidade de repetição inter-lote ELITE BeGenius								
Amostra	EBV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV
Negativo	0 / 7	N.A.	N.A.	N.A.	23 / 23	28,23	0,57	2,02
3 x LoD	8 / 8	37,45	0,65	1,72				
10 x LoD	8 / 8	35,57	0,42	1,18				

No teste da Capacidade de reprodução no **ELITE BeGenius**, o ensaio detetou o EBV alvo como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores Ct que não excederam 2,32% para EBV e 2,14% para o Controlo Interno.

Capacidade de reprodução com material de referência certificado

A sensibilidade analítica do ensaio foi avaliada utilizando como material de referência o painel calibrado «Painel "Q" Molecular EBV» (Qnostics Ltd, RU). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, deteção e interpretação do resultado, com o sistema **ELITE InGenius** e produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados, obtidos a partir de 200 µL de amostra, são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o ELITE InGenius				
Amostra	Título nominal IU/mL	Registo Log ₁₀ IU/mL do título nominal	Positivo/réplicas	Resultados médios IU/mL de Registo ₁₀
EBVMQP01-Alto	36.577	4,560	2/2	4,835
EBVMQP01-Médio	3.657	3,560	2/2	3,843
EBVMQP01-Baixo	365	2,560	2/2	2,899
EBVMQP01-Negativo	Negativo	-	0/2	-

Todas as amostras positivas foram detetadas como positivas com um título que se encontrava dentro do valor esperado de Registo ± 0,5.

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

Os resultados, obtidos a partir de 1000 µL de amostra, são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o ELITe InGenius				
Amostra	Título nominal IU/mL	Registo IU/mL do título nominal	Positivo/réplicas	Resultados médios IU/mL de Registo
EBVMQP01-Alto	36.577	4,560	2/2	4,765
EBVMQP01-Médio	3.657	3,560	2/2	3,795
EBVMQP01-Baixo	365	2,560	2/2	2,592
EBVMQP01-Negativo	negativo	-	0/2	-

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

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência o painel calibrado «AcroMetrix EBV Plasma Panel» (Life Technologies). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, deteção e interpretação do resultado, com o sistema **ELITe InGenius** e produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados, obtidos a partir de 200 µL de amostra, são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o ELITe InGenius				
Amostra	Título nominal IU/mL	Registo Log ₁₀ IU/mL do título nominal	Positivo/réplicas	Resultados médios IU/mL de Registo ₁₀
Acrometrix EBV 1E6	10 ⁶	6,000	2/2	5,791
Acrometrix EBV 1E5	10 ⁵	5,000	2/2	5,044
Acrometrix EBV 1E4	10 ⁴	4,000	2/2	3,776
Acrometrix EBV 1E3	10 ³	3,000	2/2	2,541
Acrometrix EBV 1E2	10 ²	2,000	2/2	2,034

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

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência o Painel EQA ADN do vírus Epstein-Barr QCMD 2014 (Qnostics Ltd, Escócia, Reino Unido), um painel de diluições EBV. Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, deteção e interpretação do resultado, utilizando o **ELITe InGenius** e produtos ELITechGroup S.p.A..

Os resultados, obtidos a partir de 200 µL de amostra, são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o ELITe InGenius				
Amostra	Consenso Vírus conc. IU/mL de Registo ₁₀	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios IU/mL de Registo ₁₀
EBVDNA14-01	3,504	0,212	2/2	3,439
EBVDNA14-02	3,169	0,295	2/2	2,876
EBVDNA14-03	2,500	0,310	2/2	2,275
EBVDNA14-04	3,956	0,208	2/2	4,190
EBVDNA14-05	negativo	-	0/2	-
EBVDNA14-06	3,957	0,259	2/2	3,999
EBVDNA14-07	2,962	0,220	2/2	2,953
EBVDNA14-08	3,465	0,221	2/2	3,419

Todas as amostras foram detetadas corretamente. seis (6) em sete amostras positivas foram quantificadas dentro do intervalo definido pelo consenso ± 1 de desvio padrão (DP) e uma amostra (EBVDNA14-04) foi quantificada dentro do ± 2 SD. No entanto, esta amostra está ligeiramente sobrequantificada (Registo +0,234 IU /mL enquanto o DP é igual ao Registo 0,208 IU / mL).

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

Foram realizados testes adicionais, a partir de 1000 µL de amostra, utilizando como material de referência calibrado o painel «Painel EQA ADN do vírus Epstein-Barr QCMD 2015» (Qnostics Ltd, RU). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, deteção e interpretação do resultado, com o **ELITe InGenius** e produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados, obtidos a partir de 1000 µL de amostra, são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o ELITe InGenius				
Amostra	Consenso Vírus conc. IU/mL de Registo ₁₀	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios IU/mL de Registo ₁₀
EBVDNA15C1-01	3,418	0,343	2/2	3,220
EBVDNA15C1-02	3,415	0,345	0/2	3,098
EBVDNA15C1-03	Negativo	-	2/2	-
EBVDNA15C1-04	3,955	0,305	2/2	3,697
EBVDNA15C1-05	2,493	0,516	2/2	2,136
EBVDNA15C2-01	3,956	0,350	2/2	3,662
EBVDNA15C2-02	3,942	0,347	2/2	3,697
EBVDNA15C2-03	2,886	0,374	2/2	2,622
EBVDNA15C2-04	3,952	0,377	2/2	3,732
EBVDNA15C2-05	2,912	0,340	2/2	2,723

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

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência o Painel EQA de sangue completo do vírus Epstein-Barr QCMD 2014 (Qnostics Ltd, Escócia, Reino Unido), um painel de diluições EBV. Cada amostra do painel foi testada em 4 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, deteção e interpretação do resultado, utilizando o **ELITe InGenius** e produtos ELITechGroup S.p.A..

Os resultados em IU/mL foram calculados através da aplicação do fator de conversão para o sistema **ELITe InGenius** e amostras de sangue completo e são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o ELITe InGenius				
Amostra	Consenso Vírus conc. IU/mL de Registo ₁₀	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios IU/mL de Registo ₁₀
EBVWB14-01	3,361	0,439	4/4	3,242
EBVWB14-02	2,960	0,641	4/4	2,037
EBVWB14-03	3,841	0,367	4/4	3,860
EBVWB14-04	3,845	0,362	4/4	3,786
EBVWB14-05	3,441	0,343	4/4	3,161
EBVWB14-06	4,255	0,451	4/4	4,466
EBVWB14-07	negativo	-	0/4	-
EBVWB14-08	4,889	0,290	4/4	4,955

Todas as amostras foram detetadas corretamente. seis (6) em sete amostras positivas foram quantificadas dentro do intervalo definido pelo consenso ± 1 de desvio padrão (DP) e uma amostra (EBVWB14-02) foi quantificada dentro do ± 2 SD. No entanto, esta amostra possui um título baixo e demonstrou um DP alto no estudo de proficiência.

Fator de conversão para unidades internacionais

O fator de conversão a ser utilizado com este ensaio para transformar o resultado quantitativo de cópias/mL em Unidades internacionais/mL foi determinado utilizando um painel de material de referência calibrado aprovado pela OMS ("1.^a Norma internacional da OMS para o vírus Epstein-Barr (EBV) para técnicas de amplificação de ácido nucleico", NIBSC, Reino Unido, código 09/162) e sangue completo negativo e plasma colhidos em EDTA para ADN de EBV e em associação com o **ELITe InGenius**. O painel incluiu pelo menos 3 passos de diluição de 1 Registo. Cada ponto do painel foi testado em, pelo menos, 10 réplicas realizando toda a análise, extração, amplificação, deteção e interpretação do resultado, com o **ELITe InGenius** e produtos ELITechGroup S.p.A.

É mostrado nas tabelas seguintes um resumo dos resultados.

Fator de conversão para unidades internacionais Sangue completo, Fc = 2,9 IU/cópia						
Amostra			Resultado			Diferença de registro (ref. - teste)
IU/mL	IU/mL de Registro	N	Média c. / mL	Média IU / mL	Média Registro IU / mL	
100000	5,000	10	47041	135479	5,108	- 0,108
10000	4,000	10	4509	12987	4,063	- 0,063
1000	3,000	10	223	641	2,746	+ 0,254

Fator de conversão para unidades internacionais Plasma (volume da amostra 200 µL), Fc = 1,9 IU/cópia						
Amostra			Resultado			Diferença de registro (ref. - teste)
IU/mL	IU/mL de Registro	N	Média c. / mL	Média IU / mL	Média Registro IU / mL	
100000	5,000	10	72352	137469	5,128	- 0,128
10000	4,000	10	5092	9674	3,967	+ 0,033
1000	3,000	10	435	826	2,904	+ 0,096

Fator de conversão para unidades internacionais Plasma (volume da amostra 1000 µL), Fc = 1,6 IU/cópia						
Amostra			Resultado			Diferença de registro (ref. - teste)
IU/mL	IU/mL de Registro	N	Média c. / mL	Média IU / mL	Média Registro IU / mL	
316228	5,5	16	182001	291201	5,459	+ 0,041
100000	5	16	57197	91515	4,953	+ 0,047
31623	4,5	16	20626	33002	4,510	- 0,010
10000	4	16	6911	11058	4,028	- 0,028
3162	3,5	16	2086	3338	3,514	- 0,014
1000	3	16	604	966	2,965	+ 0,035

Os resultados de cada matriz são comunicados na tabela seguinte.

Fator de conversão para unidades internacionais com o ELITe InGenius		
Volume da amostra	Matriz	Fc (IU/cópias)
200 µL	Sangue completo	2,9
	Plasma	1,9
1000 µL	Plasma	1,6

O fator de conversão, para converter um resultado quantitativo de cópias/mL para Unidades internacionais/mL, foi verificado para o **ELITe InGenius** e o **ELITe BeGenius** analisando os resultados obtidos durante o teste de linearidade.

A precisão da quantificação do alvo, como um desvio padrão de Registro IU/mL, foi menor que um Registro de 0,5 tanto para sangue completo como plasma e cumpre os critérios de aceitação para o **ELITe InGenius** e o **ELITe BeGenius**.

A precisão da quantificação do alvo, com uma diferença entre as concentrações teóricas e medidas num Registro de 0,5 tanto para sangue completo como plasma e cumpre os critérios de aceitação para o **ELITe InGenius** e o **ELITe BeGenius**.

Estes resultados confirmaram os fatores de conversão calculados para cada matriz com o **ELITe InGenius**.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada através da análise de algumas amostras clínicas de sangue completo colhido em EDTA e plasma colhido em EDTA positivas para ADN de EBV em associação com o **ELITe InGenius**. Como o **ELITe BeGenius** mostrou desempenhos analíticos equivalentes para **ELITe InGenius**, pode assumir-se que os resultados da sensibilidade de diagnóstico obtidos em associação com o instrumento **ELITe InGenius** são também aplicáveis ao **ELITe BeGenius**.

O teste, começando a partir de 200 µL de amostra, foi realizado em:

- 30 amostras de sangue completo colhido em EDTA que estavam positivas para ADN de EBV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD).

- 12 amostras de plasma colhido em EDTA de pacientes que estavam positivos para ADN de EBV (testadas como produto de amplificação em tempo real CE IVD) e em 35 amostras de plasma colhido em EDTA negativas para ADN de EBV, que foram reforçadas para ADN de CBV através da adição da "1.ª Norma internacional da OMS para o vírus Epstein-Barr para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/260, Reino Unido).

O teste, começando a partir de 1000 µL de amostra, foi realizado em 30 amostras de plasma colhido em EDTA negativo para ADN de EBV que foram reforçadas com ADN de EBV adicionando a "1.ª norma internacional da OMS para o vírus Epstein-Barr para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/260, Reino Unido).

Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração, amplificação, deteção e interpretação de resultados com o **ELITe InGenius** e com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Volume da amostra	Amostras	N	positivo	negativo
200 µL	Sangue completo colhido em EDTA e positivo para ADN de EBV	30	30	0
	Plasma colhido em EDTA e positivo para ADN de EBV	12	12	0
	Plasma colhido em EDTA reforçado com ADN de EBV	35	35	0
1000 µL	Plasma colhido em EDTA reforçado com ADN de EBV	30	29	1

Todas as amostras de sangue completo foram confirmadas como válidas positivas para ADN de EBV. A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 100%.

Todas as amostras de plasma (200 µL) foram confirmadas válidas positivas para ADN do EBV. A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 100%.

Vinte e nove (29) em 30 amostras de plasma (1000 µL) foram confirmadas como válidas positivas para ADN de EBV, uma amostra foi divergente negativa. A sensibilidade de diagnóstico do ensaio nestes testes foi igual a 96,7%.

Todas as amostras, analisadas a partir de 1000 µL de amostra, foram válidas para análise, 29 em 30 amostras de plasma foram confirmadas positivas, uma amostra foi discrepante negativa. A sensibilidade de diagnóstico do ensaio nestes testes foi igual a 96,7%.

A sensibilidade de diagnóstico total do ensaio nestes testes foi igual a 99%.

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi avaliada através da análise de algumas amostras clínicas de sangue completo e plasma negativo para ADN de EBV em associação com o **ELITe InGenius**. Como o **ELITe BeGenius** mostrou desempenhos analíticos equivalentes para **ELITe InGenius**, pode assumir-se que os resultados da especificidade de diagnóstico obtidos em associação com o instrumento **ELITe InGenius** são também aplicáveis ao **ELITe BeGenius**.

O teste, começando a partir de 200 µL de amostra, foi realizado em:

- 32 amostras de sangue completo colhido em EDTA que estavam negativas para ADN de EBV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD).

- 61 amostras de plasma colhido em EDTA que estavam negativas para ADN de EBV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD),

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

O teste, começando a partir de 1000 µL de amostra, foi realizado em 62 amostras de plasma colhido em EDTA e presumivelmente negativas para ADN de EBV.

Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação de resultados com o **ELITe InGenius** e com produtos ELITeGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Volume da amostra	Amostras	N	positivo	negativo
200 µL	Sangue completo colhido em EDTA e negativo para ADN de EBV	32	3	29
	Plasma colhido em EDTA e negativo para ADN de EBV	61	1	60
1000 µL	Plasma colhido em EDTA e presumivelmente negativo para ADN de EBV	62	2	60

Vinte e nove (29) em 32 amostras de sangue completo foram confirmadas como válidas negativas para ADN de EBV, três amostras foram discrepantes positivas a um título baixo. Estas amostras a título baixo encontram-se abaixo do limite de detecção do método para ADN - EBV, estas amostras podem aleatoriamente testar negativas ou positivas. Os resultados discrepantes podem explicar-se tendo em consideração que o EBV é um vírus amplamente disseminado na população de uma forma latente.

A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste com sangue completo foi igual a 90,6%.

Sessenta (60) em 61 amostras de plasma (200 µL) foram confirmadas como válidas negativas para ADN de EBV, uma amostra foi discrepante positiva a um título baixo. Esta amostra tinham um título próximo do limite de detecção do método para ADN - EBV, esta amostra pode aleatoriamente testar negativa ou positiva. O resultado discrepante pode explicar-se tendo em consideração que o EBV é um vírus amplamente disseminado na população de uma forma latente.

A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste com plasma foi igual a 98,4%.

Sessenta (60) em 62 amostras de plasma (1000 µL) foram confirmadas como válidas negativas para ADN de EBV, duas amostras foram discrepantes positivas a um título baixo. Esta amostra tinham um título próximo do limite de detecção do método para ADN - EBV, esta amostra pode aleatoriamente testar negativa ou positiva. O resultado discrepante pode explicar-se tendo em consideração que o EBV é um vírus amplamente disseminado na população de uma forma latente.

A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 96,8%.

A especificidade de diagnóstico total do ensaio nestes testes foi igual a 96%.

O valor de corte do Ct de Controlo Interno (IC Ct) é fixado em 35.

Nota: Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e os instrumentos estão registados na Secção 7 do Ficheiro técnico do produto "EBV ELITe MGB® Kit", FTP RTS020PLD.

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

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

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser utilizado com o **ADN extraído** das seguintes amostras biológicas:

Sangue completo colhido em EDTA

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

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

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de sangue completo através do kit «**EXTRAblood**», siga o manual de instruções de funcionamento: comece com **200 µL** da amostra (máximo de 2 milhões de leucócitos), elua o ADN em **100 µL** de tampão de eluição.

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

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

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de sangue completo com o instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**», siga o protocolo de extração **Generic 2.0.1** e siga estas instruções: transfira **100 µL** da amostra para a tira de 8 furos, carregue a tira no instrumento e efetue a extração **sem incubação de lise**. Após o instrumento ter adicionado o **Tampão lise EasyMAG®**, sem remover a tira, misture três vezes o conteúdo da tira através da pipeta de vários canais, utilizando o número do programa 3. Faça a incubação durante 10 minutos, em seguida adicione a **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** ao conteúdo da tira pela pipeta de vários canais, utilizando o programa número 3; em seguida, prossiga com a extração. Elua os ácidos nucleicos em **50 µL** de tampão de eluição.

Nota: quando realizar a extração de ADN de sangue completo com o instrumento «**QIASymphony® SP/AS**» e o kit «**QIASymphony® DNA Mini Kit**» com a **versão do software 3.5**, utilize o protocolo de extração **Virus Blood_200_V4_default IC** e siga estas instruções: o instrumento é capaz de utilizar um tubo primário, o volume de amostra necessário para a extração é **200 µL**, é sempre necessário um volume morto mínimo de 100 µL. Carregue no instrumento, na ranhura do "controle interno", os tubos que contêm o tampão ATE, como indicado no manual de instruções de utilização do kit; indique a posição onde os eluatos serão distribuídos e especifique o volume de eluição de **60 µL** (a eluição é feita normalmente em 90 µL, dos quais 60 µL são recuperados). Para obter mais informações sobre o procedimento de extração, siga as indicações no manual de instruções de utilização do kit.

Plasma colhido em EDTA

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

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

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

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de plasma com o **ELITe STAR** e com **software versão 3.4.13** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **“UUNI_E100S_200_ELI”**, que utiliza 200 µL de amostra e elui o extrato em 100 µL (a eluição é feita normalmente em 115 µL, dos quais 100 µL são recuperados). As amostras nos tubos primários podem ser carregadas diretamente no **“ELITe STAR”**. É sempre necessário um volume mínimo de 400-600 µL para cada amostra. Adicione **200 µL de CPE** ao tubo Proteinase-Carrier como indicado no manual do kit de extração. Para o procedimento de extração, consulte o manual de instruções de utilização do kit de extração.

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de plasma com o **“ELITe GALAXY”** com **software versão 1.3.1** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **Extração xNA (Universal)**, que utiliza 300 µL de amostra e elui o extrato em 210 µL ou 200 µL (a eluição é feita normalmente em 210 µL, dos quais 200 µL são recuperados). As amostras nos tubos primários podem ser carregadas diretamente no **“ELITe GALAXY”**. É sempre necessário um volume mínimo de 400-650 µL, dependendo da classe do tubo usado, para cada amostra. Adicione **10 µL/amostra de CPE**. O CPE deve ser adicionado à solução de **CI + Carrier** como indicado no manual do kit de extração. Para o procedimento de extração, consulte o manual de instruções de utilização do kit de extração.

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

Líquido cefalorraquidiano (LCR)

As amostras de LCR para extração de ácido nucleico devem ser colhidas de acordo com as diretrizes laboratoriais evitando a contaminação pelo sangue do doente, transportadas a +2°/+8 °C e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de quatro horas, caso contrário, devem ser congeladas e guardadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos.

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

Substâncias interferentes

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

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

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

Controlos de amplificação

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

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

Para o controlo positivo, utilize o produto **«EBV ELITe Positive Control»** ou o produto **«EBV ELITe Standard»**.

Controlos da qualidade

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

Os controlos externos devem ser usados em conformidade com as organizações de acreditação locais, estatais e federais, consoante aplicável. Um exemplo de controlos externos disponíveis no mercado é o “Painel Q Molecular EBV” (ref. EBVMQP01 da Qnostics Ltd, RU).

PROCEDIMENTO

Definição da sessão de amplificação em tempo real

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

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

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

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

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

Veja a seguir, a título de exemplo, como pode organizar as análises quantitativas de 12 amostras.

S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
NC	102	103	104	105							

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

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

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

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

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

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

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

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

- ligar o ciclo térmico em tempo real, ligar o computador, executar o software dedicado e abrir uma sessão "quantificação absoluta", bem como definir o "Modo de execução: Rápido 7500";
- definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda EBV com o "dispositivo de relatório" = "FAM" e o "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) " e dar-lhe o nome "EBV";
- definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda de controlo interno com o "dispositivo de relatório" = "VIC" (AP525 é semelhante ao VIC) e o "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) " e dar-lhe o nome "CI";

- para cada furo em utilização na microplaca, defina (Inspetor do furo) o "detetor" (tipo de fluorescência a ser medida), a "referência passiva" = "Cy5" (é usado AP593 em vez de Cy5, para a normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (amostra, controlo de amplificação negativo, controlo de amplificação positivo ou padrão de quantidade conhecido). Adicione esta informação à **Ficha de trabalho** anexada no final deste manual ou imprima a preparação da microplaca. A **Ficha de trabalho** deve ser atentamente seguida durante a transferência da mistura de reação e das amostras para os furos.

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

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

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

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

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

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

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

Preparação da amplificação

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

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

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

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

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

- Com a pipeta, introduza exatamente, colocando na mistura de reação, **20 µL** de **ADN extraído** da primeira amostra no furo correspondente da **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem a amostra introduzindo com a pipeta o **ADN extraído** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma com as outras amostras de **ADN extraído**.

- Com a pipeta, introduza exatamente, colocando na mistura de reação, **20 µL** de **água de qualidade para biologia molecular** (não fornecida com este produto) no furo da **microplaca da amplificação** do controlo negativo da amplificação, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o controlo negativo introduzindo com a pipeta a **água de qualidade para biologia molecular** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.

- Com base no resultado necessário (qualitativo ou quantitativo), deve seguir uma das destas duas opções:
- quando for necessário um resultado **qualitativo** (detecção de ADN de EBV): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **EBV - ELITe Positive Control** no furo correspondente na **Amplification microplate**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**.

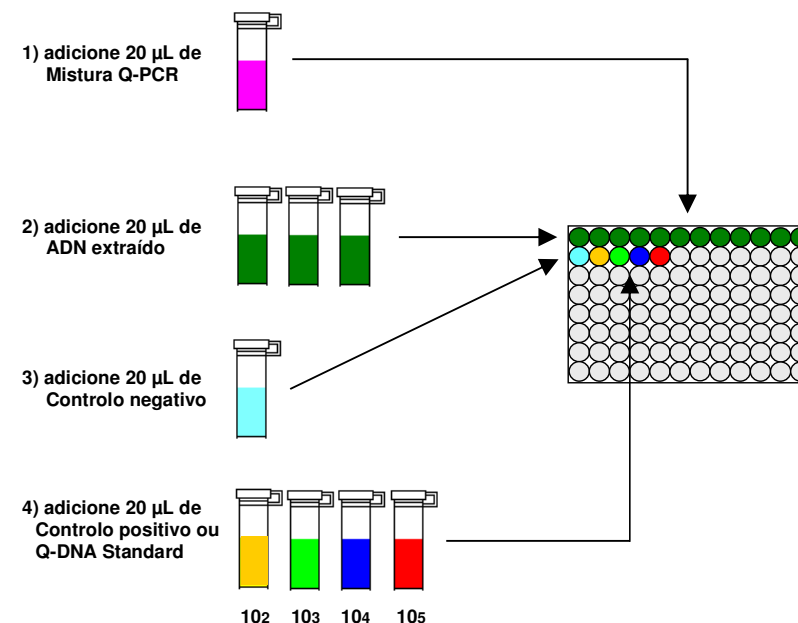
Misture bem o controlo positivo introduzindo com a pipeta o **EBV - ELITe Positive Control** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.

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

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

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

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



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

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

Análise qualitativa dos resultados

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

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

Nota: No caso de uma amostra positiva com um elevado título de ADN de EBV, a fluorescência FAM da sonda específica do EBV pode começar a aumentar antes do ciclo 15. Neste caso, o intervalo de cálculo para a **Linha de base** deve ser adaptada desde o ciclo 6 até ao ciclo em que a fluorescência FAM da amostra começa a aumentar, como detetado pelo software do instrumento (Resultados > Componente).

Quando é usado um instrumento **Sistema de PCR em tempo real 7300**:

- defina manualmente o **Limiar** para o detetor FAM "EBV" para **0,1**;
- defina manualmente o **Limiar** para o detetor VIC "CI" para **0,05**.

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

- defina manualmente o **Limiar** para o detetor FAM "EBV" para **0,2**;
- defina manualmente o **Limiar** para o detetor VIC "CI" para **0,1**.

Os valores de fluorescência emitidos pelas sondas específicas na reação de amplificação e o valor do **Limiar** de fluorescência permitem determinar o **Ciclo do limiar (Ct)**, o ciclo em que a fluorescência alcançou o valor do **Limiar**.

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

Positive Control reaction detector FAM "EBV"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETO

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

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

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

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

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

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

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

Este produto é capaz de detetar uma quantidade mínima de cerca de 10 cópias de ADN do gene EBNA-1 de EBV na reação de amplificação, que corresponde aos 10 Equivalentes do genoma por reação (limite de deteção para o produto, consulte o parágrafo Características de desempenho).

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

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

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct não determinado** para o EBV e **Ct > 35** ou **Ct** não determinado para o Controlo interno, significa que foi impossível detetar eficientemente o ADN para o Controlo interno. Neste caso, ocorreram problemas durante o passo de amplificação (amplificação ineficiente ou inexistente) ou durante o passo de extração (degradação do ADN da amostra, amostra com um número de células demasiado baixo, perda de ADN durante a extração ou presença de inibidores no ADN extraído) que podem originar resultados incorretos e falsos negativos. A amostra não é adequada, o ensaio é inválido e precisa ser repetido, começando pela extração de uma nova amostra.

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

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

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

Análise quantitativa dos resultados

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

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

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

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

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

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

Este produto é capaz de quantificar desde 1.000.000 a 10 cópias de ADN do gene EBNA-1 do EBV na reação de amplificação, que corresponde aos Equivalentes do genoma por reação (intervalo de medição linear do produto, consulte Características de desempenho), tal como descrito na tabela seguinte:

Sample result detector FAM "EBV"	Equivalentes do genoma EBV por reação
Quantidade > 1 x 10 ⁶	MAIS DE 1.000.000
1 x 10 ⁵ ≤ Quantidade ≤ 1 x 10 ⁶	= Quantidade
Quantidade < 1 x 10 ⁵	MENOS DE 10

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

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

Onde:

Vc é a quantidade da amostra usada na extração relativamente à unidade de medição exigida,

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

Ve é o volume total do produto de extração **expresso em µL**,

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

Quantidade é o resultado da reação de amplificação da amostra **expressa em gEq por reação**.

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

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

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

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

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

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

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

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

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

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

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

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

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = 12 \times Quantidade$$

Cálculo dos limites do intervalo de medição

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

$$\begin{aligned} \text{Limite inferior (gEq/mL)} &= \frac{Ve \times 10 \text{ gEq}}{Vc \times Va \times Ep} \\ \text{Limite superior (gEq/mL)} &= \frac{Ve \times 1.000.000 \text{ gEq}}{Vc \times Va \times Ep} \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} \text{Limites do intervalo de medição (gEq/mL) com «EXTRAblood»} \\ \text{Limite inferior (gEq/mL)} &= 25 \times 10 \text{ gEq} \\ \text{Limite superior (gEq/mL)} &= 25 \times 1.000.000 \text{ gEq} \\ &\text{de 250 a 25.000.000 gEq/mL} \end{aligned}$$

Quando é usado o sistema de extração «**ELITe STAR**» com amostras celulares e não celulares, a fórmula passa a ser:

$$\begin{aligned} \text{Limites do intervalo de medição (gEq/mL) com ELITe STAR} \\ \text{Limite inferior (gEq/mL)} &= 28 \times 10 \text{ gEq} \\ \text{Limite superior (gEq/mL)} &= 28 \times 1.000.000 \text{ gEq} \\ &\text{de 280 a 28.000.000 gEq/mL} \end{aligned}$$

Quando é usado o sistema de extração «**ELITe GALAXY**» com amostras celulares e não celulares, a fórmula passa a ser:

$$\begin{aligned} \text{Limites do intervalo de medição (gEq/mL) com «ELITe GALAXY»} \\ \text{Limite inferior (gEq/mL)} &= 35 \times 10 \text{ gEq} \\ \text{Limite superior (gEq/mL)} &= 35 \times 1.000.000 \text{ gEq} \\ &\text{de 350 a 35.000.000 gEq/mL} \end{aligned}$$

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

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

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

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

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

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

Limites do intervalo de medição (gEq/mL) com « QIASymphony® SP/AS »
Limite inferior (gEq/mL) = 12 x 10 gEq
Limite superior (gEq/mL) = 12 x 1.000.000 gEq
de 120 a 120.000.000 gEq/mL

Conversão dos resultados em unidades internacionais (IU)

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

Fórmula simplificada para sangue completo e « EXTRAblood »
Fc = 2,0 IU/gEq
Nc (IU/mL) = Nc (gEq/mL) x Fc
Nc (IU/mL) = 50 x Quantidade

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

Fórmula simplificada para sangue completo e o ELITe STAR
Fc = 2,09 IU/gEq
Nc (IU/mL) = Nc (gEq/mL) x Fc
Nc (IU/mL) = 58,2 x Quantidade

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

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

Fórmula simplificada para plasma e « ELITe STAR »
Fc = 2,15 IU/gEq
Nc (IU/mL) = Nc (gEq/mL) x Fc
Nc (IU/mL) = 60,2 x Quantidade

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

Fórmula simplificada para sangue completo e o ELITe GALAXY
Fc = 0,89 IU/gEq
Nc (IU/mL) = Nc (gEq/mL) x Fc
Nc (IU/mL) = 31,2 x Quantidade

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

Fórmula simplificada para plasma e « ELITe GALAXY »
Fc = 0,76 IU/gEq
Nc (IU/mL) = Nc (gEq/mL) x Fc
Nc (IU/mL) = 26,6 x Quantidade

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

Fórmula simplificada para sangue completo e « NucliSENS® easyMAG® »
Fc = 1,7 IU/gEq
Nc (IU/mL) = Nc (gEq/mL) x Fc
Nc (IU/mL) = 85 x Quantidade

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

Fórmula simplificada para sangue completo e « QIASymphony® SP/AS »
Fc = 1,8 IU/gEq
Nc (IU/mL) = Nc (gEq/mL) x Fc
Nc (IU/mL) = 41 x Quantidade

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

Fórmula simplificada para plasma e « QIASymphony® SP/AS »
Fc = 2,3 IU/gEq
Nc (IU/mL) = Nc (gEq/mL) x Fc
Nc (IU/mL) = 28 x Quantidade

Onde **Fc** for o fator de conversão estabelecido utilizando o material de referência calibrado aprovado pela OMS "1.^a Norma internacional da OMS para o vírus Epstein-Barr para técnicas de amplificação de ácido nucleico", NIBSC código 09/260, Reino Unido (ver o parágrafo Características de desempenho).

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade analítica: limite de deteção

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

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

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
10 cópias de ADN plasmídico + 500 ng de ADN genómico humano	50	50	0

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de sangue completo e o **ELITe STAR** foi verificada com um painel de diluições de EBV dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da "1.^a norma internacional da OMS para o vírus Epstein-Barr para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/260, Reino Unido) em ADN EBV - sangue completo EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 3,160 IU/mL a 1000 IU/mL. Cada amostra do painel foi testada em 8 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração e Configuração PCR com o **ELITe STAR** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

Os resultados finais são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de sangue completo e ELITe STAR (IU/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	212 UI / mL	113 UI / mL	805 UI / mL

A sensibilidade analítica como gEq/mL está reportada a seguir

Limite de deteção para amostras de sangue completo e ELITe STAR (gEq/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	101 gEq/mL	54 gEq/mL	385 gEq/mL

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de plasma e o **ELITe STAR** foi verificada com um painel de diluições de EBV dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da "1.^a norma internacional da OMS para o vírus Epstein-Barr para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/260, Reino Unido) em ADN EBV - plasma EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 3,160 IU/mL a 1000 IU/mL. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração e Configuração PCR com o **ELITe STAR** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

Os resultados finais são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de plasma e ELITe STAR (IU/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	229 UI / mL	108 UI / mL	1571 UI / mL

A sensibilidade analítica como gEq/mL está reportada a seguir

Limite de deteção para amostras de plasma e ELITe STAR (gEq/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	107 gEq/mL	50 gEq/mL	731 gEq/mL

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de sangue completo e o **ELITe GALAXY** foi verificada com um painel de diluições de EBV dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da "1.^a norma internacional da OMS para o vírus Epstein-Barr para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/260, Reino Unido) em ADN EBV - sangue completo EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 10 IU/mL a 560 IU/mL. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração e Configuração PCR com o **ELITe GALAXY** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

Os resultados finais são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de sangue completo e ELITe GALAXY (IU/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	99 UI / mL	57 UI / mL	376 UI / mL

A sensibilidade analítica como gEq/mL está reportada a seguir

Limite de deteção para amostras de sangue completo e ELITe GALAXY (gEq/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	111 gEq/mL	64 gEq/mL	422 gEq/mL

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de plasma e o **ELITe GALAXY** foi verificada com um painel de diluições de EBV dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da "1.^a norma internacional da OMS para o vírus Epstein-Barr para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/260, Reino Unido) em ADN EBV - plasma EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 10 IU/mL a 560 IU/mL. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração e Configuração PCR com o **ELITe GALAXY** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

Os resultados finais são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de plasma e ELITe GALAXY (IU/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	97 IU/mL	66 IU/mL	284 IU/mL

A sensibilidade analítica como gEq/mL está reportada a seguir

Limite de deteção para amostras de plasma e ELITe GALAXY (gEq/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	128 gEq/mL	87 gEq/mL	374 gEq/mL

Sensibilidade analítica: intervalo de medição linear

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

A sensibilidade analítica deste ensaio, enquanto intervalo de medição linear, foi determinada com recurso a um painel de diluições (1 Registro₁₀ entre uma diluição e a seguinte) de ADN plasmídico contendo o produto de amplificação, cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. As diluições de 10⁷ moléculas por reação a 10¹ moléculas por reação foram testadas em 9 réplicas através da realização da amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

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

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

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

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

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

Os limites do intervalo de medição como gEq/mL referentes ao kit de extração usado são calculados na página 34.

Sensibilidade analítica: Precisão e exatidão

A precisão do ensaio, enquanto variabilidade dos resultados obtidos com várias réplicas de uma amostra testada dentro da mesma sessão, permitiu obter uma percentagem média do Coeficiente de variação (% CV) de cerca de 21,0% das quantidades medidas, dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas nos 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A precisão do ensaio, enquanto diferença entre a média dos resultados obtidos com várias réplicas de uma amostra dentro da mesma sessão e a concentração teórica da amostra, permitiu obter uma percentagem média de Imprecisão (% Imprec.) de cerca de 11,1% das quantidades medidas, dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas nos 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

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

Sensibilidade analítica: capacidade de reprodução com material de referência calibrado

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

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência calibrado um painel de diluições de EBV dentro do limite de concentração ("Painel EQA do ADN do vírus Epstein-Barr QCMD 2008, Qnostics Ltd, Escócia, RU). Cada amostra foi testada em duplicados através da realização de toda a análise: extração com «EXTRAblood» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados				
Amostra	Consenso conc. vírus no ensaio comercial Log ₁₀ gEq / mL	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios gEq/mL Registro ₁₀
EBV08-01	EBV, 2,394	0,473	2/2	1,937
EBV08-02	EBV, 3,177	0,476	2/2	3,185
EBV08-03	EBV, 3,443	0,400	2/2	3,021
EBV08-04	EBV, 4,159	0,391	2/2	4,089
EBV08-05	EBV, 2,707	0,504	2/2	2,408
EBV08-06	Negativo, NA	-	0/2	-
EBV08-07	EBV, 3,857	0,349	2/2	3,796
EBV08-08	EBV, 5,131	0,361	2/2	4,930
EBV08-09	EBV, 4,414	0,358	2/2	4,186
EBV08-10	EBV, 2,651	0,456	2/2	2,458

Todas as amostras foram detetadas corretamente. Os resultados quantitativos estão dentro do intervalo definido pelo Desvio padrão ± 1 do consenso do ensaio comercial ± 1 desvio padrão, exceto para a amostra EBV08-03.

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência calibrado um painel de diluições de EBV dentro do limite de concentração ("Painel EQA do ADN do vírus Epstein-Barr QCMD 2012, Qnostics Ltd, RU). Cada amostra foi testada em duplicados através da realização de todo o procedimento de análise: extração com **ELITe STAR** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados em gEq/mL são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o ELITe STAR				
Amostra	Consenso conc. vírus no ensaio comercial Log ₁₀ gEq / mL	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios gEq/mL Registro ₁₀
EBV12-01	EBV, 2,719	0,446	1/2	1,885
EBV12-02	EBV, 3,802	0,417	2/2	3,794
EBV12-03	EBV, 5,173	0,358	2/2	5,168
EBV12-04	EBV, 4,790	0,421	2/2	4,569
EBV12-05	EBV, 4,313	0,371	2/2	4,064
EBV12-06	EBV, 4,458	0,373	2/2	4,334
EBV12-07	EBV, 4,769	0,384	2/2	4,416
EBV12-08	EBV, 3,471	0,403	2/2	3,324
EBV12-09	EBV, 3,313	0,446	2/2	3,128
EBV12-10	Negativo, NA	-	0/2	-

Todas as amostras negativas foram detetadas corretamente. Na análise quantitativa, 8/9 amostras positivas foram corretamente quantificadas dentro do intervalo definido pelo ensaio comercial do Desvio padrão ± 1 do consenso. Uma amostra (EBV12-01) foi quantificada dentro do SD ± 2 . Este resultado pode ser explicado devido ao facto de o título da amostra estar perto do limite de deteção do método usado.

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

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

Testes com materiais de referência calibrados e o ELITe STAR				
Amostra	Consenso conc. vírus no ensaio comercial Log ₁₀ UI / mL	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios IU/mL de Registo ₁₀
EBV12-01	EBV, 2,473	0,386	1/2	2,217
EBV12-02	EBV, 3,635	0,422	2/2	4,126
EBV12-03	EBV, 4,987	0,307	2/2	5,500
EBV12-04	EBV, 4,646	0,295	2/2	4,901
EBV12-05	EBV, 4,138	0,300	2/2	4,396
EBV12-06	EBV, 4,345	0,333	2/2	4,666
EBV12-07	EBV, 4,631	0,270	2/2	4,749
EBV12-08	EBV, 3,470	0,442	2/2	3,657
EBV12-09	EBV, 3,161	0,394	2/2	3,460
EBV12-10	Negativo, NA	-	0/2	-

Todas as amostras negativas foram detetadas corretamente. Na análise quantitativa, 7/9 amostras positivas foram corretamente quantificadas dentro do intervalo definido pelo ensaio comercial do Desvio padrão ± 1 do consenso. Duas amostras (EBV12-02 e EBV12-03) foram quantificadas dentro de ± 2 DP.

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência calibrado um painel de diluições de EBV dentro do limite de concentração ("Painel EQA do ADN do vírus Epstein-Barr QCMD 2012, Qnostics Ltd, RU). Cada amostra foi testada em duplicados através da realização de todo o procedimento de análise: extração e Configuração PCR com o **ELITe GALAXY** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados em gEq/mL são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o ELITe GALAXY				
Amostra	Consenso conc. vírus no ensaio comercial Log ₁₀ gEq / mL	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios gEq/mL Registo ₁₀
EBV12-01	EBV, 2,719	0,446	2/2	2,763
EBV12-02	EBV, 3,802	0,417	2/2	3,638
EBV12-03	EBV, 5,173	0,358	2/2	5,060
EBV12-04	EBV, 4,790	0,421	2/2	4,598
EBV12-05	EBV, 4,313	0,371	2/2	4,063
EBV12-06	EBV, 4,458	0,373	2/2	4,319
EBV12-07	EBV, 4,769	0,384	2/2	4,597
EBV12-08	EBV, 3,471	0,403	2/2	3,258
EBV12-09	EBV, 3,313	0,446	2/2	3,224
EBV12-10	Negativo, NA	-	0/2	-

Todas as amostras negativas foram corretamente detetadas como negativas e todas as amostras positivas foram detetadas como positivas em conformidade com os resultados quantitativos definidos pelo consenso dos ensaios comerciais.

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

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

Testes com materiais de referência calibrados e o ELITe GALAXY				
Amostra	Consenso conc. vírus no ensaio comercial Log ₁₀ UI / mL	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios IU/mL de Registo ₁₀
EBV12-01	EBV, 2,473	0,386	2/2	2,644
EBV12-02	EBV, 3,635	0,422	2/2	3,518
EBV12-03	EBV, 4,987	0,307	2/2	4,941
EBV12-04	EBV, 4,646	0,295	2/2	4,479
EBV12-05	EBV, 4,138	0,300	2/2	3,944
EBV12-06	EBV, 4,345	0,333	2/2	4,200
EBV12-07	EBV, 4,631	0,270	2/2	4,478
EBV12-08	EBV, 3,470	0,442	2/2	3,139
EBV12-09	EBV, 3,161	0,394	2/2	3,105
EBV12-10	Negativo, NA	-	0/2	-

Todas as amostras negativas foram corretamente detetadas como negativas e todas as amostras positivas foram detetadas como positivas em conformidade com os resultados quantitativos definidos pelo consenso dos ensaios comerciais.

Sensibilidade analítica: Fator de conversão para unidades internacionais

O fator de conversão a usar com este ensaio para conversão do resultado quantitativo de gEq / mL em Unidades Internacionais / mL foi definido como 2,0 Unidades Internacionais / gEq quando foram usadas amostras de sangue completo e o «EXTRAblood» manual extraction kit; como 2,2 Unidades Internacionais / gEq quando foram usadas amostras de sangue completo e o automatic extraction system ELITe STAR; como 0,8 Unidades Internacionais / gEq quando foram usadas amostras de sangue completo e o automatic extraction system ELITe GALAXY; como 1,7 Unidades Internacionais / gEq quando foram usadas amostras de sangue completo e o «NucliSENS® easyMAG®» automatic extraction system; 1,8 Unidades Internacionais / gEq quando foram usadas amostras de sangue completo e o «QIAAsymphony® SP/AS» automatic extraction system; como 2,0 Unidades Internacionais / gEq quando foram usadas amostras de plasma e o ELITe STAR; 0,7 Unidades Internacionais / gEq quando foram usadas amostras de plasma e o automatic extraaction system ELITe GALAXY; como 2,3 Unidades Internacionais / gEq quando foram usadas amostras de plasma e o «QIAAsymphony® SP/AS» automatic extraction system.

Sangue completo colhido em EDTA

O fator de conversão foi calculado utilizando um painel de quatro diluições (0,5 Registo₁₀ entre diluições) de material de referência calibrado aprovado pela OMS ("1.^a Norma Internacional da OMS para o vírus Epstein-Barr para técnicas de amplificação de ácido nucleico", NIBSC código 09/260, Reino Unido) em sangue completo colhido em EDTA.

Cada ponto do painel foi testado em 8 réplicas através da realização de toda a análise, extração com «EXTRAblood» e amplificação, com produtos ELITechGroup S.p.A.

A análise dos dados obtidos permite calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 2,0 Unidades internacionais (IU) por gEq de EBV detetado com amostras de sangue completo.

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Conversão para Unidades internacionais com sangue completo e «EXTRAblood» (Fc = 2,0 IU/gEq)				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registo ₁₀	Quantidade média gEq/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registo ₁₀
316.255	5,500	154.718	30,4034	5,48
100.000	5,000	51.264	100.737	5,00
31.625	4,500	15.602	30.660	4,49
10.000	4,000	5.438	10.686	4,03

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

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

A análise dos dados obtidos permite calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 2,2 Unidades internacionais (IU) por gEq de EBV detetado com amostras de sangue completo.

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Conversão para Unidades internacionais com sangue completo e ELITe STAR (Fc = 2,09 IU/gEq)				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registro ₁₀	Quantidade média gEq/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registro ₁₀
3.162	3,500	1.295	2.709	3,339
10.000	4,000	5.116	10.703	3,976
31.623	4,500	18.300	38.283	4,559
100.000	5,000	55.188	115.453	5,034
316.228	5,500	177.128	370.551	5,537

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

A análise dos dados obtidos permite calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 0,8 Unidades internacionais (IU) por gEq de EBV detetado com amostras de sangue completo.

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Conversão para Unidades internacionais com sangue completo e ELITe GALAXY (Fc = 0,89 IU/gEq)				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registro ₁₀	Quantidade média gEq/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registro ₁₀
3.162	3,500	3.821	3.400	3,518
10.000	4,000	13.623	12.124	4,101
31.623	4,500	32.547	28.967	4,460
100.000	5,000	120.239	107.013	5,028
316.228	5,500	281.782	250.786	5,390

Cada ponto do painel foi testado em 8 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática «NucliSENS® easyMAG®» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

A análise dos dados obtidos permite calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 1,7 Unidades internacionais (IU) por gEq de EBV detetado com amostras de sangue completo.

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Conversão para Unidades internacionais com sangue completo e «NucliSENS® easyMAG®» (Fc = 1,7 IU/gEq)				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registro ₁₀	Quantidade média gEq/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registro ₁₀
316.255	5,500	212.198	366.796	5,56
100.000	5,000	56.930	98.407	4,99
31.625	4,500	20.334	35.148	4,55
10.000	4,000	4.734	8.183	3,91

Cada ponto do painel foi testado em 8 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática «QIAAsymphony® SP/AS» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

A análise dos dados obtidos permite calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 1,8 Unidades internacionais (IU) por gEq de EBV detetado com amostras de sangue completo.

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Conversão para Unidades internacionais com sangue completo e «QIAAsymphony® SP/AS» (Fc = 1,8 IU/gEq)				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registro ₁₀	Quantidade média gEq/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registro ₁₀
316.255	5,500	203251	365852	5,563
100.000	5,000	61830	111294	5,046
31.625	4,500	18174	32713	4,515
10.000	4,000	4546	8183	3,913
3.162	3,500	1850	3330	3,522
1.000	3,000	575	1035	3,015

Plasma colhido em EDTA

O fator de conversão foi calculado utilizando um painel de quatro diluições (0,5 Registro₁₀ entre diluições) de material de referência calibrado aprovado pela OMS ("1.ª Norma Internacional da OMS para o vírus Epstein-Barr para técnicas de amplificação de ácido nucleico", NIBSC código 09/260, Reino Unido) em plasma colhido em EDTA.

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

A análise dos dados obtidos permite calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 2,0 Unidades internacionais (IU) por gEq de EBV detetado com amostras de plasma.

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Conversão para Unidades internacionais com plasma e ELITe STAR (Fc = 2,15 IU/gEq)				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registro ₁₀	Quantidade média gEq/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registro ₁₀
316.255	5,500	167.105	359.275	5,537
100.000	5,000	45.185	97.147	4,961
31.625	4,500	17.428	37.470	4,555
10.000	4,000	4.536	9.753	3,993
3.162	3,500	1.435	3.084	3,454

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

A análise dos dados obtidos permite calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 0,7 Unidades internacionais (IU) por gEq de EBV detetado com amostras de plasma.

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Conversão para Unidades internacionais com plasma e ELITe GALAXY (Fc = 0,76 IU/gEq)				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registro ₁₀	Quantidade média gEq/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registro ₁₀
3.162	3,500	5.610	4.263	3,608
10.000	4,000	15.554	11.821	4,050
31.623	4,500	39.837	30.276	4,451
100.000	5,000	148.584	112.924	5,035
316.228	5,500	308.566	234.510	5,334

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS020PLD

Cada ponto do painel foi testado em 8 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática «QIASymphony® SP/AS» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

A análise dos dados obtidos permitiu calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a 2,3 Unidades internacionais (IU) por gEq de EBV detetado utilizando amostras de plasma.

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Conversão para Unidades internacionais com plasma e «QIASymphony® SP/AS» (Fc = 2,3 IU/gEq)				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registro ₁₀	Quantidade média gEq/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registro ₁₀
316.255	5,500	110.437	249.588	5,39
100.000	5,000	37.691	85.181	4,93
31.625	4,500	14.498	32.765	4,51
10.000	4,000	7.442	16.819	4,22

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

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

A análise das regiões escolhidas para a hibridização dos primários e da sonda fluorescente no alinhamento das sequências disponíveis na base de dados para o gene EBNA-1 do EBV revelou a respetiva conservação e ausência de mutações significativas.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi testada com recurso a algumas amostras clínicas de líquido cefalorraquidiano e sangue completo colhidos em EDTA, com teste positivo para ADN de HHV6.

A sensibilidade diagnóstica foi avaliada usando como material de referência 21 amostras de sangue completo colhidas em EDTA, todas positivas para ADN de EBV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD) e 21 amostras de líquido cefalorraquidiano negativo para ADN de EBV e reforçadas com as amostras EBV09-04, EBV09-05 e EBV09-06 de QCMD 2009 ADN do vírus Epstein-Barr Painel EQA (Qnostics Ltd, Escócia, Reino Unido). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte:

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue completo colhido em EDTA e positivo para ADN de EBV	21	21	0
Líquido cefalorraquidiano reforçado com ADN de EBV	21	21	0

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

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

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 31 amostras de plasma colhido em EDTA que foram positivas para ADN de EBV e 31 amostras de sangue completo colhido em EDTA que foram positivas para ADN de EBV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração com **ELITe STAR** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Plasma colhido em EDTA positivo para ADN de EBV	31	29	2
Sangue completo colhido em EDTA e positivo para ADN de EBV	31	30	1

Três amostras comunicaram um resultado negativo com produtos ELITechGroup S.p.A.. Esta discordância pode ser explicada pelo título EBV das amostras, que foi calculado próximo do limite de deteção do método.

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 95,2%.

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS020PLD

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 30 amostras de plasma colhido em EDTA que foram positivas para ADN de EBV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD) e 32 amostras de sangue completo colhido em EDTA que foram positivas para ADN de EBV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi usada para a realização de todo o procedimento de análise: extração e Configuração PCR com o **ELITe GALAXY** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Plasma colhido em EDTA positivo para ADN de EBV	30	29	1
Sangue completo colhido em EDTA e positivo para ADN de EBV	32	32	0

Uma amostra de plasma apresentou um resultado negativo com produtos ELITechGroup S.p.A.. Esta discordância pode ser explicada por uma provável má conservação da amostra.

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

Especificidade analítica: ausência de reatividade cruzada com marcadores potencialmente interferentes

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

A análise do alinhamento das sequências dos primários e da sonda fluorescente com as sequências disponíveis nas bases de dados para organismos diferentes do EBV, incluindo o genoma completo do HHV8, o vírus herpético humano que é o mais semelhante ao EBV, revelou a respetiva especificidade e a ausência de homologia significativa.

A especificidade analítica do ensaio, como ausência de reatividade cruzada com outros marcadores potencialmente interferentes, foi verificada utilizando algumas amostras clínicas negativas para ADN de EBV e positivas para ADN de outros patogénicos.

A especificidade analítica foi verificada utilizando como material de referência 20 amostras de sangue completo colhido em EDTA, que foram negativas para ADN de EBV mas positivas para ADN de CMV ou ADN de HHV6 (testadas com produtos de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue completo colhido em EDTA e positivo para ADN de CMV	11	0	11
Sangue completo colhido em EDTA e positivo para ADN de HHV6	9	0	9

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

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi testada com recurso a algumas amostras clínicas negativas de ADB de EBV e líquido cefalorraquidiano e sangue completo colhidos em EDTA, com testes negativos para ADN de HHV6.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como referência 29 amostras de sangue completo colhido em EDTA e 21 amostras de líquido cefalorraquidiano que estavam negativas para ADN de EBV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue completo negativo para ADN de EBV	29	1	28
Líquido cefalorraquidiano negativo para ADN de EBV	21	0	18

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

Uma amostra de sangue completo apresentou resultado positivo para ADN de EBV com um título muito baixo (cerca de 3 cópias / reação) na primeira sessão de análise. A mesma amostra apresentou-se negativa, válida na segunda sessão. Este resultados discordantes podem ser explicados tendo em conta o baixo título de ADN de ADV, abaixo do limite de deteção do método de referência.

Três amostras de líquido cefalorraquidiano apresentaram um resultado inválido, possivelmente pela presença de um inibidor e não foram usadas no cálculo da especificidade. A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 97,9%.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 40 amostras de plasma colhido em EDTA que foram negativas para ADN de EBV e 60 amostras de sangue completo colhido em EDTA que foram negativas para ADN de EBV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração e Configuração PCR com o «**ELITe STAR**» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Plasma colhido em EDTA negativo para ADN de EBV	40	0	40
Sangue completo colhido em EDTA negativo para ADN de EBV	60	3	53

Quatro amostras de sangue completo foram inválidas. Três amostras de sangue completo resultaram num discrepante positivo (58 gEq/mL, 107 gEq/mL e 37 gEq/mL, respetivamente). Estas amostras a título baixo encontram-se abaixo do limite de deteção do método para ADN - EBV, estas amostras podem aleatoriamente testar negativas ou positivas. Os resultados discrepantes podem explicar-se tendo em consideração que o EBV é um vírus amplamente disseminado na população de uma forma latente.

A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 96,9%.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 30 amostras de plasma colhido em EDTA que foram negativas para ADN de EBV e 32 amostras de sangue completo colhido em EDTA que foram negativas para ADN de EBV (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi usada para a realização de todo o procedimento de análise: extração e Configuração PCR com o **ELITe GALAXY** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Plasma colhido em EDTA negativo para ADN de EBV	30	0	30
Sangue completo colhido em EDTA negativo para ADN de EBV	32	1	31

Uma amostra de sangue completo resultou num discrepante positivo (18 gEq/mL). Esta amostra tinham um título próximo do limite de deteção do método para ADN - EBV, esta amostra pode aleatoriamente testar negativa ou positiva. O resultado discrepante pode explicar-se tendo em consideração que o EBV é um vírus amplamente disseminado na população de uma forma latente.

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

Nota: Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e os instrumentos estão registados na Secção 7 do Ficheiro técnico do produto "EBV ELITe MGB® Kit", FTP RTS020PLD.

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

Roche cobas z 480 analyzer

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser utilizado com o **ADN extraído** das seguintes amostras clínicas:

Sangue completo colhido em EDTA

As amostras de sangue completo para extração de ADN devem ser colhidas em EDTA de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas a +2°/+8 °C e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de três dias, caso contrário, devem ser congeladas e guardadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C para períodos mais longos. Recomenda-se a separação das amostras a serem congeladas em alíquotas para evitar ciclos repetidos de congelação e descongelação. Quando utilizar amostras congeladas, descongele as mesmas apenas imediatamente antes da extração, para evitar uma possível degradação do ácido nucleico.

Nota: quando realizar a extração de ADN de amostras de sangue completo com o instrumento "**MagNA Pure 24 System**" com **software versão 1.0** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração "**Pathogen200**" siga estas instruções: distribua **350 µL** da amostra para o tubo de 2,0 mL de MagNA Pure, carregue o tubo no instrumento e inicie a extração. Este protocolo processa 200 µL de amostra, adiciona **CPE** a 20 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL. O **CPE** deve ser diluído 1:2 em água de qualidade para biologia molecular ultra pura. Para obter mais informações sobre o procedimento de extração, siga atentamente as instruções incluídas no Manual do utilizador do kit.

Plasma colhido em EDTA

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

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

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

Nota: quando realizar a extração de ADN de amostras de plasma com o instrumento "**MagNA Pure 24 System**" com **software versão 1.0** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração "**Pathogen200**" siga estas instruções: distribua **350 µL** da amostra para o tubo de 2,0 mL de MagNA Pure, carregue o tubo no instrumento e inicie a extração. Este protocolo processa 200 µL de amostra, adiciona **CPE** a 20 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL. O **CPE** deve ser diluído 1:2 em água de qualidade para biologia molecular ultra pura. Para obter mais informações sobre o procedimento de extração, siga atentamente as instruções incluídas no Manual do utilizador do kit.

Substâncias interferentes

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

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

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

Controlos de amplificação

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

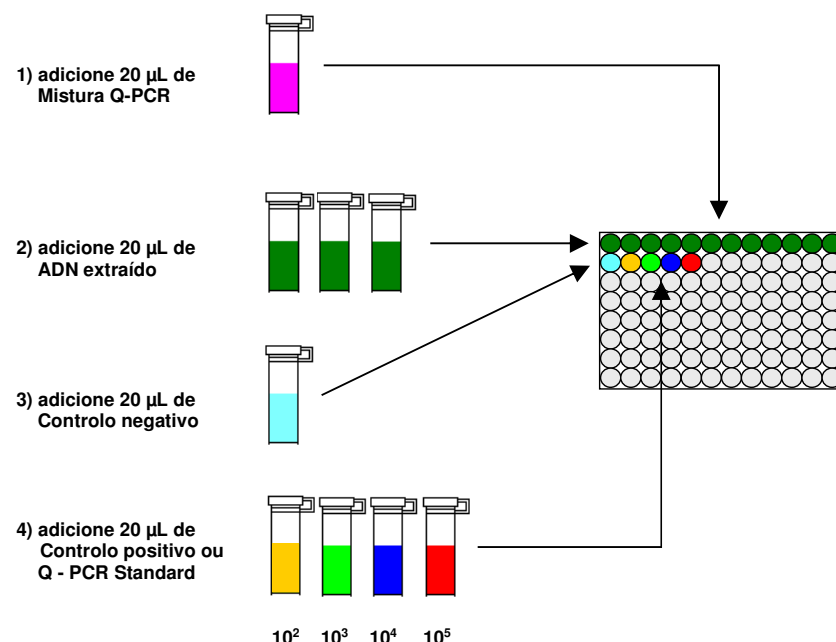
Para o controlo negativo, adicione água de qualidade para biologia molecular ultra pura (não fornecida com este kit) à reação no lugar do ADN extraído a partir da amostra.

Para o controlo positivo, utilize o produto «**EBV - ELITe Positive Control**» ou, em alternativa, o produto «**EBV - ELITe Positive Control RF**» ou o produto «**EBV ELITe Standard**».

Controlos da qualidade

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

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



Análise dos resultados qualitativos

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

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

Selecione o grupo de amostras a serem analisadas

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

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

Para amostras de **Plasma**:

- defina manualmente o **Limiar** e **Banda de ruído** para o detetor FAM "EBV" para **0,55**;
- defina manualmente o **Limiar** e **Banda de ruído** para o detetor VCI "CI" para **1,2**;

Para amostras de **sangue completo**:

- defina manualmente o **Limiar** e **Banda de ruído** para o detetor FAM "EBV" para **0,80**;
- defina manualmente o **Limiar** e **Banda de ruído** para o detetor VCI "CI" para **1,5**;

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

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

Reaction Positive Control "EBV" detector	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETO

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

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

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

Reação de controlo negativo Detetor "EBV"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct não determinado	NEGATIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação **Controlo negativo** for diferente de **Ct não determinado** para EBV, foi detetada a presença do ADN alvo. Ocorreram problemas durante a fase de amplificação (contaminação) que podem causar resultados incorretos e falsos positivos. A sessão é inválida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

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

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

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

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

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS020PLD

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

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

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

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

Análise dos resultados quantitativos

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

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

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

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

Resultado da amostra Detetor FAM "EBV"	Cópias EBV por reação
Quantidade > 1 x 10 ⁶	MAIS DE 1.000.000
1,0 x 10 ¹ ≤ Quantidade ≤ 1 x 10 ⁶	= Quantidade
Quantidade < 1,0 x 10 ¹	MENOS DE 10

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

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

Onde:

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

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

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

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

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

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS020PLD

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

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

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade analítica: limite de deteção

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

A sensibilidade analítica deste ensaio, como limite de deteção, foi testado usando um ADN de plasmídeo que contém o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida usando um espectrofotómetro. O ADN de plasmídeo foi diluído para uma concentração de 10 cópias/20 µL em 150.000 cópias de pBETAGLOBIN/20 µL. Esta amostra foi utilizada em 18 réplicas para realizar a amplificação utilizando produtos ELITechGroup S.p.A.. Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivos	negativos
10 cópias de ADN de plasmídeo + 150.000 cópias de pBETAGLOBIN	18	18	0

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de sangue completo plasma e o **MagNA Pure 24** foi verificada com um painel de diluições de EBV dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da "1.^a norma internacional da OMS para vírus Epstein-Barr (EBV) para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/260, Reino Unido) em ADN EBV - matriz negativa. O painel era constituído por seis pontos à volta da concentração limite. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas através da realização da extração utilizando o sistema automático **MagNA Pure 24** e amplificação utilizando produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

Os resultados finais são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção com o MagNA Pure 24 IU/mL (IU/mL)			
Matriz	95% de positividade	intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
sangue completo	143 IU/mL	87 IU/mL	413 IU/mL
plasma	163 IU/mL	82 IU/mL	1137 IU/mL

A sensibilidade analítica como cópias/mL para cada matriz é calculada através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 51.

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

Limite de deteção com o MagNA Pure 24 (cópias/mL)			
Matriz	95% de positividade	intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
sangue completo	102 cópias/mL	62 cópias/mL	295 cópias/mL
plasma	125 cópias/mL	63 cópias/mL	875 cópias/mL

Sensibilidade analítica: intervalo de medição linear

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

A sensibilidade analítica deste ensaio foi avaliada com recurso a um painel de diluições (1 registo₁₀ entre uma diluição e a seguinte) de ADN de plasmídeo contendo o produto de amplificação, cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. Os pontos do painel de 10⁷ moléculas por reação a 10¹ moléculas por reação foram testadas em 9 réplicas para realização da amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

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

O limite inferior do intervalo de medição linear foi definido a cerca de 10 cópias/reação dentro de 1 algoritmo desde a concentração mais baixa do standard de amplificação Q - PCR Standard (10^2 cópias/20 μ L).

O limite superior do intervalo de medição linear foi definido a 10^6 cópias/reação, dentro de um algoritmo desde a concentração mais alta do standard de amplificação Q - PCR Standard (10^5 cópias/20 μ L).

Os resultados estão mostrados na tabela seguinte.

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

As conversões de cópias/mL para cópias/reação e vice-versa foram calculadas como mostrado na página 51.

A linearidade deste ensaio usado em associação com diferentes matrizes e o **MagNA Pure 24** foi verificada com um painel de diluições de EBV. O painel foi preparado através da diluição da "1.^a norma internacional da OMS para vírus Epstein-Barr (EBV) para técnicas de amplificação de ácido nucleico" (NIBSC código 09/260, Reino Unido) em ADN EBV - matriz negativa. O painel era constituído por cinco pontos de diluição (passos de diluição de 1 Registro₁₀) a partir de 10^6 IU/mL a 10^2 IU/mL. Cada amostra do painel foi testada em quatro réplicas através da realização da extração utilizando o sistema automático **MagNA Pure 24** e amplificação utilizando produtos ELITechGroup S.p.A. A análise dos dados obtidos, realizada por regressão linear, demonstrou que o ensaio mostra uma resposta linear para todas as diluições acima do LoD.

Limite de quantificação

O limite inferior do intervalo de medição linear foi definido à concentração mais baixa a fornecer 100% de positividade e resultados quantitativos suficientemente exatos e precisos. O limite superior do intervalo de medição linear foi definido à concentração mais alta testada que fornece resultados quantitativos suficientemente exatos e precisos.

O intervalo de medição linear como cópias/mL para cada matriz é calculada através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 51.

Os resultados de cada matriz são comunicados nas tabelas seguintes.

Intervalo de medição linear para amostras de sangue completo e o MagNA Pure 24		
Unidade de medida	limite inferior	limite superior
IU/mL	178	1.000.000
cópias/mL	127	714.286

Intervalo de medição linear para amostras de plasma e o MagNA Pure 24		
Unidade de medida	limite inferior	limite superior
IU/mL	178	1.000.000
cópias/mL	137	769.231

Sensibilidade analítica: Precisão e exatidão

A precisão deste ensaio, em termos de variabilidade dos resultados obtidos na mesma sessão de amplificação utilizando diferentes réplicas de uma amostra, permitiu obter uma percentagem média do Coeficiente de variação (% VC) dos valores de Ct inferior a 2%, dentro do intervalo de 10^6 moléculas a 10^1 moléculas em 20 μ L de ADN adicionado à reação de amplificação.

A precisão deste ensaio, em termos de variabilidade dos resultados obtidos na mesma sessão de amplificação utilizando diferentes réplicas de uma amostra, permitiu obter uma percentagem média do Coeficiente de variação (% VC) das quantidades medidas de cerca de 11% dentro do intervalo de 10^6 moléculas a 10^1 moléculas em 20 μ L de ADN adicionado à reação de amplificação.

EBV ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF RTS020PLD

A precisão deste ensaio, em termos de diferença entre a média dos resultados obtidos na mesma sessão de amplificação utilizando diferentes réplicas de uma amostra e o valor de concentração teórica da amostra, permitiu obter uma percentagem média de Imprecisão da quantidade de Registro medida de cerca de 1,1% dentro do intervalo de 10^6 moléculas a 10^1 moléculas em 20 μ L de ADN adicionado à reação de amplificação.

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

Capacidade de reprodução com material de referência certificado

A sensibilidade analítica do ensaio, como a capacidade de reprodução do valor de um material de referência calibrado, foi avaliada utilizando como material de referência o painel calibrado «Painel "Q" molecular de EBV (Qnostics, Ltd, RU). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas através da realização da extração utilizando o sistema automático **MagNA Pure 24** e amplificação utilizando produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados em IU/mL foram calculados através da aplicação do fator de conversão para o **MagNA Pure 24 System** e plasma e são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o MagNA Pure 24				
Amostra	Título nominal IU/mL	Registro Log ₁₀ IU/mL do título nominal	Positivo/réplicas	Resultados médios IU/mL de Registro ₁₀
EBVMQP01-Alto	36.577	4,560	2/2	4,586
EBVMQP01-Médio	3.657	3,560	2/2	3,553
EBVMQP01-Baixo	365	2,560	2/2	2,664
EBVMQP01-Negativo	negativo	-	0/2	-

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

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência o painel calibrado «AcroMatrix EBV Plasma Panel» (Life Technologies). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas através da realização da extração utilizando o sistema automático **MagNA Pure 24** e amplificação utilizando produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados em IU/mL foram calculados através da aplicação do fator de conversão para o **MagNA Pure 24 System** e plasma e são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o MagNA Pure 24				
Amostra	Título nominal IU/mL	Registro Log ₁₀ IU/mL do título nominal	Positivo/réplicas	Resultados médios IU/mL de Registro ₁₀
Acrometrix EBV 1E6	10^6	6,000	2/2	5,987
Acrometrix EBV 1E5	10^5	5,000	2/2	5,152
Acrometrix EBV 1E4	10^4	4,000	2/2	4,208
Acrometrix EBV 1E3	10^3	3,000	2/2	3,147
Acrometrix EBV 1E2	10^2	2,000	2/2	2,246

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

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência o Painel EQA ADN do vírus Epstein-Barr QCMD 2017 (Qnostics Ltd, Escócia, Reino Unido), um painel de diluições EBV. Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas através da realização da extração utilizando o sistema automático **MagNA Pure 24** e amplificação utilizando produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados em IU/mL foram calculados através da aplicação do fator de conversão para o **MagNA Pure 24 System** e plasma e são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o MagNA Pure 24			
Amostra	Consenso Vírus conc. IU/mL de Registo ₁₀	Positivo/réplicas	Resultados médios IU/mL de Registo ₁₀
EBVDNA17S-01	3,885	2/2	3,884
EBVDNA17S-02	3,906	2/2	3,742
EBVDNA17S-03	2,903	2/2	2,928
EBVDNA17S-04	2,952	2/2	2,819
EBVDNA17S-05	2,181	2/2	1,817
EBVDNA17S-06	3,215	2/2	3,188
EBVDNA17S-07	3,899	2/2	3,974
EBVDNA17S-08	2,315	2/2	1,908
EBVDNA17S-09	-	0/2	-
EBVDNA17S-10	2,333	2/2	2,184

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

Fator de conversão para unidades internacionais

O fator de conversão a ser utilizado com este ensaio para transformar o resultado quantitativo de cópias/mL em Unidades internacionais/mL foi determinado utilizando o painel de material de referência calibrado aprovado pela OMS ("1.^a Norma internacional da OMS para o vírus Epstein-Barr (EBV) para técnicas de amplificação de ácido nucleico", NIBSC, Reino Unido, código 09/162) e nas várias matrizes negativas para ADN de EBV e em associação com o **MagNA Pure 24**. O painel incluiu 6 passos de diluição de 1 Registo. Cada ponto do painel foi testado em 16 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática **MagNA Pure 24** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

A análise dos dados obtidos permitiu calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a **1,4** Unidades internacionais (IU) por cópias de EBV detetado com amostras de **sangue completo**.

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Conversão para Unidades internacionais com sangue completo e «MagNA Pure 24» (Fc = 1,4 IU/cópias)				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registo ₁₀	Quantidade média cópias/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registo ₁₀
111.055	5,046	81.828	119.952	5,074
34.903	4,543	26.663	38.395	4,575
10.970	4,040	7.705	11.095	4,033
3.448	3,538	2.275	3.276	3,503
1.084	3,035	711	1.024	2,994
341	2,532	275	395	2,572

A análise dos dados obtidos permitiu calcular um fator de conversão médio (Fc) igual a **1,3** Unidades internacionais (IU) por cópias de EBV detetado com amostras de **plasma**.

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Conversão para Unidades internacionais com plasma e «MagNA Pure 24» (Fc = 1,3 IU/cópias)				
Conc. esperada IU/mL	Conc. esperada IU/mL Registo ₁₀	Quantidade média cópias/mL	Quantidade média IU/mL	Quantidade média IU/mL Registo ₁₀
111.055	5,046	77.250	101.313	4,993
34.903	4,543	26.743	34.766	4,523
10.970	4,040	8.462	11.000	4,028
3.448	3,538	2.616	3.401	3,519
1.084	3,035	687	893	2,937
341	2,532	255	332	2,486

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade diagnóstica foi avaliada tendo como material de referência 34 amostras de sangue completo colhido em EDTA negativo para ADN de EBV adicionando "1.^a Norma Internacional da OMS para o vírus Epstein-Barr para técnicas de amplificação do ácido nucleico" (NIBSC, Reino Unido, código 09/260) e 30 amostras de plasma colhido em EDTA negativo para ADN de EBV que foram reforçadas para ADN de EBV adicionando "1.^a Norma Internacional da OMS para o vírus Epstein-Barr para técnicas de amplificação do ácido nucleico" (NIBSC, Reino Unido, código 09/260).

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

Amostras	N	positivos	negativos
Sangue completo colhido em EDTA reforçado para ADN de EBV	34	34	0
Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de EBV	30	30	0

Todas as amostras foram válidas no primeiro teste.

Todas as amostras de sangue completo e plasma foram confirmadas positivas para ADN de EBV. A sensibilidade de diagnóstico do ensaio associado às amostras de sangue completo e de plasma foi de 100%.

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 34 amostras de sangue completo colhido em EDTA presumivelmente negativas para ADN de EBV e 31 amostras de plasma colhido em EDTA presumivelmente negativas para ADN de EBV.

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

Amostras	N	positivos	negativos
Sangue completo colhido em EDTA presumivelmente negativo para ADN de EBV	34	0	34
Plasma colhido em EDTA e presumivelmente negativo para ADN de EBV	31	1	30

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

A especificidade de diagnóstico do ensaio associada às amostras de sangue completo foi de 100%.

Todas as amostras foram válidas no primeiro teste. Trinta (30) em 31 amostras de plasma foram confirmadas negativas para ADN de EBV, enquanto uma amostra mostrou resultado discrepante positivo.

A especificidade de diagnóstico do ensaio associado às amostras de plasma foi de 96,8%.

A especificidade de diagnóstico total do ensaio foi de 98,5%.

Nota: Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e os instrumentos estão registados na Secção 7 do Ficheiro técnico do produto "EBV ELITE MGB® Kit", FTP RTS020PLD.

REFERÊNCIAS

S. W. Aberle et al. (2002) *J Clin Virology* 25: S79 - S85
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Utilize este produto apenas com ADN extraído das seguintes amostras humanas: sangue completo colhido em EDTA, plasma colhido em EDTA e líquido cefalorraquidiano.

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

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

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

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

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

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

Devido à sua elevada sensibilidade analítica, o método de amplificação em Tempo real usado neste produto é sensível a contaminações cruzadas a partir de amostras positivas para EBV, dos controlos positivos e dos mesmos produtos de amplificação. Contaminações cruzadas causadas por falsos resultados positivos. O formato do produto é capaz de limitar contaminações cruzadas. 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 vestuário e áreas de trabalho que sejam adequados para o processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

Este produto deve ser manuseado por pessoal qualificado e com formação em técnicas de biologia molecular, como extração, amplificação e deteção de ácidos nucleicos, para evitar resultados incorretos.

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

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

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

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

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

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

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

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

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

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

ADN alvo detetado na reação de Controlo negativo	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	Evite derramar o conteúdo do tubo de teste da amostra. Mude sempre as pontas entre uma amostra e a outra. Tenha cuidado quando distribuir amostras, controlos negativos, controlos positivos e standards para os furos da microplaca e cumpra a ficha de trabalho.
Preparação da sessão incorreta no ELITe InGenius e no ELITe BeGenius.	Verifique a posição da mistura de reação ou do controlo negativo. Verifique os volumes da mistura de reação ou do controlo negativo.
Erro durante a definição do instrumento	Verifique as definições de posição das amostras, dos controlos negativos, dos controlos positivos e dos standards no instrumento.
Microplaca mal vedada.	Tenha cuidado quando vedar a microplaca.
Contaminação da água de qualidade para biologia molecular.	Utilize uma nova alíquota de água.
Contaminação da mistura de reação.	Use uma nova alíquota da mistura de reação.
Contaminação da área de extração/preparação para reações de amplificação.	Limpe as superfícies e instrumentos com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos de ensaio e as pontas em utilização.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

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

Níveis de fluorescência de fundo irregulares ou elevados nas reações	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta da amostra.	Tenha cuidado, inserindo a pipeta três vezes, quando misturar amostras, controlos negativos, controlos positivos ou standards na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.
Erro na configuração da linha de base.	Defina o intervalo de cálculo da linha de base dentro dos ciclos onde a fluorescência de fundo já estabilizou (verifique os dados "Resultados", "Componente") e a fluorescência do sinal ainda não tenha começado a aumentar, por ex. do ciclo 9 para o ciclo 15. Utilize o cálculo automático da linha de base configurando a opção "Linha de base auto".

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

Erro 30103 no ELITe InGenius	
Causas possíveis	Soluções
Concentração demasiado alta do alvo na amostra.	Se for observada uma amplificação significativa no lote PCR: - repita a amplificação com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR Only" ou - repita a extração com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular da amostra numa sessão "Extração + PCR".

SÍMBOLOS

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

**NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA
LIMITADA**

Este produto contém reagentes produzidos pela Life Technologies Corporation e são vendidos ao abrigo de contratos de licenciamento celebrados entre a ELITechGroup S.p.A. e respetivas sucursais e a Life Technologies Corporation. 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, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Telefone: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. E-mail: outlicensing@thermofisher.com.

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

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

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

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

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

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

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

EBV ELITE MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS020PLD



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

A. Intended use

The EBV ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection and quantification** of the DNA of **Epstein-Barr human herpesvirus**. The assay is CE-IVD validated in combination with the instruments **ELITE InGenius** and **ELITE BeGenius**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
EBV	EBNA-1	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525 (VIC)

C. Validated matrix

› **Whole blood** EDTA

› **Plasma** EDTA

D. Kit content

EBV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

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

E. Material required not provided in the kit

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> › ELITE InGenius instrument: INT030 › ELITE BeGenius instrument: INT040 › ELITE InGenius SP200 Extraction Cartridge: INT032SP200 › ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR › ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS › CPE - Internal Control: CTCRPE | <ul style="list-style-type: none"> › EBV ELITE Standard : STD020PLD › EBV - ELITE Positive Control : CTR020PLD › ELITE InGenius Waste Box : F2102-000 › 300 µL Filter Tips Axygen : TF-350-L-R-S › 1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118 |
|---|---|

F. Protocol

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

G. Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	104 IU/mL – 36 cp/mL	100% 30/30*	90.6% 29/32*
Plasma (200 µL)	124 IU/mL – 65 cp/mL	100% 47/47*	98.4% 60/61*
*confirmed samples/ tested samples			
Matrix	Linearity (copies/mL)	Linearity (IU/mL)	Conversion factor cp/mL to IU/mL
Whole Blood	36 - 344,828	104 – 1,000,001	2.9
Plasma (200 µL)	65 - 526,316	124– 1,000,000-	1.9

H. Reference material tested with ELITE InGenius

Panel name	Provider	Qualitative results	Quantitative results
EBV Molecular Q Panel	Qnostics	Concordance 100% (4/4)*	Titre as expected value ± 0.5 log
AcroMatrix EBV Plasma Panel	Life Technologies	Concordance 100% (5/5)*	Titre as expected value ± 0.5 log
QCMD 2014 Epstein-Barr Virus DNA EQA Panel	Qnostics	Concordance 100% (8/8)*	Titre as expected value ± 1 log 1 sample Titer as expected value ± 2 log

*confirmed samples/ tested samples

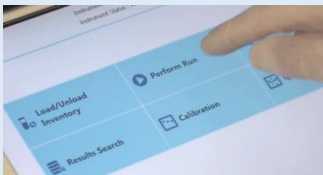
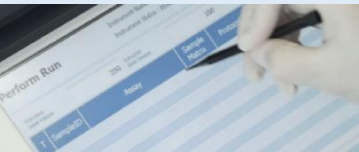
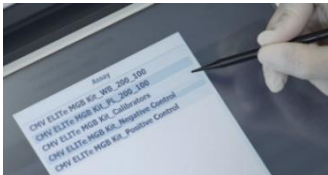
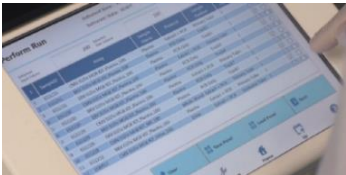
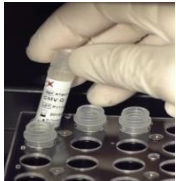
I. Procedures ELITE InGenius

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

Before analysis

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

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

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

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position : Primary tube or Secondary tube	6. Load the CPE Internal Control in the inventory block
7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, sonication tube and primary sample racks	8. Close the door Start the run	9. Archive the eluate sample

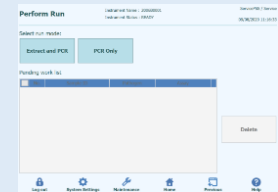
L. Procedures ELITE BeGenius

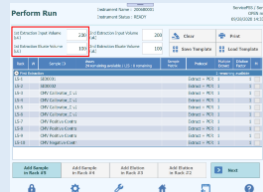
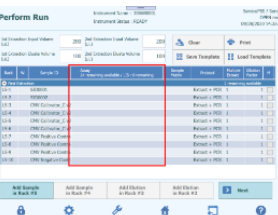
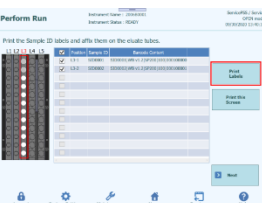
The user is guided step-by-step by the ELITE BeGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

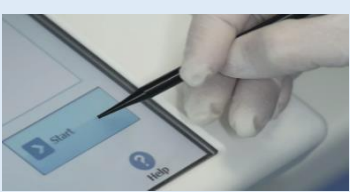
1. Switch on ELITE BeGenius Identification with username and password
Select the mode "Closed"
2. Verify calibrators: EBV Q-PCR standard in the "Calibration menu"
Verify controls: EBV pos. and neg. controls in the "Control menu"
NB: Both have been run, approved and not expired
3. Thaw the EBV Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes
Vortex gently
Spin down 5 sec

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

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

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

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

4. Select the "Assay protocol" of interest

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

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

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

8. Close the door. Start the run

9. View, approve and store the results


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

Procedure 2 - PCR only

1. Select "Perform Run" on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»
2. Load the extracted nucleic acid barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area
3. Select the "Assay protocol" of interest
4. Load the Q-PCR-Mix in Reagent Rack and insert it in the cooling area
Load filter tips and the PCR rack
5. Close the door.
Start the run
6. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

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

EBV ELITE MGB® kit used with ELITE InGenius®

Code: RTS020PLD



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

A. Intended use

The EBV ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection** and **quantification** of the DNA of **Epstein-Barr human herpesvirus**. The assay is CE-IVD validated in combination with the instrument **ELITE InGenius**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
Internal Control	EBNA-1	FAM
	Human beta globin gene	AP525 (VIC)

C. Validated matrix

› **Whole blood** EDTA

› **Plasma** EDTA

D. Kit content

EBV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

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

E. Material required not provided in the kit

- › **ELITE InGenius instrument**: INT030
- › **ELITE InGenius SP1000** Extraction Cartridge: INT033SP1000
- › **ELITE InGenius PCR Cassette** amplification cartridges: INT035PCR
- › **ELITE InGenius SP200 Consumable Set** consumables for extraction: INT032CS

- › **EBV ELITE Standard** : STD020PLD
- › **EBV ELITE Positive Control**: CTR020PLD
- › **CPE Internal Control**: CTRCPE
- › **ELITE InGenius Waste Box**: F2102-000
- › **Filter Tips 300**: TF-350-L-R-S

F. ELITE InGenius protocol

› Sample volume	1000 µL	› Unit of quantitative result	International Unit: IU/mL
› CPE Internal Control volume	10 µL		copies/mL
› Total eluate volume	100 µL	› Frequency of controls	15 days
› PCR eluate input volume	20 µL	› Frequency of calibration	60 days
› EBV Q-PCR Mix volume	20 µL		

G. Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Plasma (1000 µL)	18 IU/mL – 11 cp/mL	96.7% 29/30*	96.8% 60/62 *confirmed samples/ tested samples
Matrix	Linearity (copies/mL)	Linearity (IU/mL)	Conversion factor cp/mL to IU/mL
Plasma (1000 µL)	62 - 625,000	99 - 1,000,000	1.6

H. Reference material tested

Panel name	Provider	Qualitative results	Quantitative results
EBV Molecular Q Panel	Qnostics	Concordance 100% (4/4)*	Titre as expected value ± 0.5 log
QCMD 2015 Epstein-Barr virus DNA EQA Panel	Qnostics	Concordance 100% (10/10)*	Titre as expected value ± 1 log

*confirmed samples/ tested samples

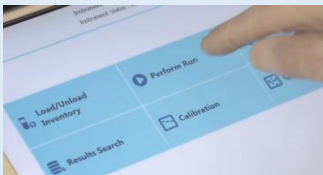
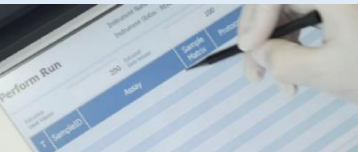
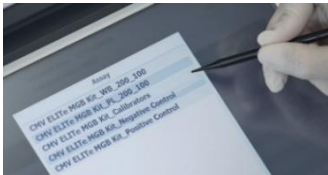
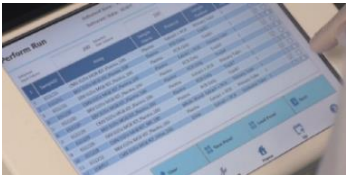
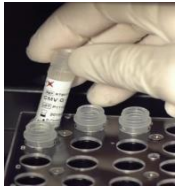
I. Procedures

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

Before analysis

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

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen 	2. Verify the extraction volumes: Input: "1000 µL", eluate: "100 µL" 	3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID 
4. Select the "Assay protocol" of interest 	5. Select the sample position: Primary tube or sonication tube 	6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in the inventory block 
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, sonication tube and primary sample racks 	8. Close the door Start the run 	9. View, approve and store the results 

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position : Primary tube or Secondary tube	6. Load the CPE Internal Control in the inventory block
7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, sonication tube and primary sample racks	8. Close the door Start the run	9. Archive the eluate sample

EBV ELITe MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Code: RTS020PLD



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

A. Intended use

The EBV ELITe MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection** and **quantification** of the DNA of **Epstein-Barr human herpesvirus**.

The assay is CE-IVD validated in combination with **ABI PCR thermal cyclers** (Thermo-Fisher) and the following extraction systems: **ELITe STAR** (ELITechGroup), **ELITe GALAXY** (ELITechGroup), **easyMAG** (BioMérieux) or **QIAAsymphony** (Qiagen).

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
EBV	EBNA-1	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525 (VIC)

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA

› Plasma EDTA

› Cerebrospinal fluid

D. Kit content

EBV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 100
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › 7500 Fast Dx and 7300 PCR Instrument
- › ELITe STAR: INT010
- › ELITe STAR 200 extraction kit: INT011EX
- › ELITe GALAXY: INT020
- › ELITe GALAXY 300 extraction kit: INT021EX

- › EBV ELITe Positive Control: CTR020PLD
- › EBV ELITe Standard: STD020PLD
- › CPE Internal Control: CTRCPE
- › easyMAG - Generic protocol 2.0.1
- › QIAAsymphony - DNA Mini kit or DSP Virus/Pathogen Midi kit
- › Molecular biology grade water

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ELITe STAR - ABI	Whole Blood	212 IU/mL – 101 gEq/mL	95.2% (30/31)*	96.9% (53/60)*
	Plasma	229 IU/mL – 107 IU/mL	95.2% (29/30)*	100% (40/40)*
ELITe GALAXY - ABI	Whole Blood	99 IU/mL – 111 gEq/mL	100% (32/32)*	96.9% (31/32)*
	Plasma	97 IU/mL – 128 gEq/mL	96.67% (29/30)*	100% (30/30)*

System	Linearity	Conversion factor cp/reaction to cp/mL
ELITe STAR - ABI	280 → 28 x 10 ⁶ (WB, PL)	28 (WB, PL)
ELITe GALAXY - ABI	350 → 35 x 10 ⁶ (WB, PL)	35 (WB, PL)
easyMAG - ABI	500 → 50 x 10 ⁶ (WB)	50 (WB)
QIAAsymphony - ABI	230 → 23 x 10 ⁶ (WB)	23 (WB)
	120 → 12 x 10 ⁶ (PL)	12 (PL)

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

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

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELiTe Star	Whole Blood, Plasma	200 µL	700 µL	100 µL	200µL
ELiTe Galaxy	Whole Blood, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	Whole Blood, Plasma	500 µL	-	100 µL	5 µL
QIAsymphony	Whole Blood, Plasma	500 µL	600 µL	85 µL	6 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

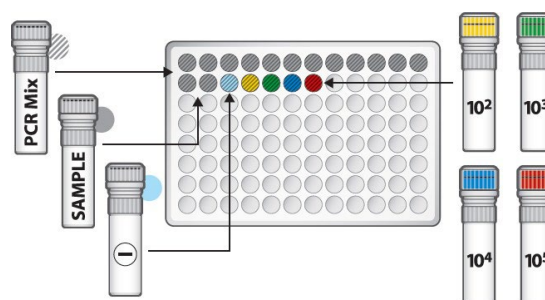
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "EBV" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition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

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

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

Amplification - PCR Set -up

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



Amplification - Threshold for qualitative analysis

Instrument	EBV FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	0.1	0.05

Interpretation - Qualitative results

EBV Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	-	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

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

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ gEq/reaction.

EBV ELITE MGB® kit used with Cobas-Z 480 PCR instruments

Code: RTS020PLD



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

A. Intended use

The EBV ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection** and **quantification** of the DNA of **Epstein-Barr human herpesvirus**.

The assay is CE-IVD validated in combination with **Cobas – Z 480 analyzer (Roche)** and the following extraction systems: **MagNA Pure 24 System**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
EBV	EBNA-1	FAM (465 – 510)
Internal Control	Human beta globin gene	VIC (540 - 580)

C. Validated matrix

- › Whole Blood
- › Plasma EDTA

D. Kit content

EBV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL

X 4

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

E. Material required not provided in the kit

- › Cobas – Z 480 analyzer PCR Instrument
- › MagNA Pure 24 System = software 1.0
- › EBV - ELITE Positive Control: CTR020PLD
EBV – ELITE Positive Control RF: CTR020PLD-R
- › EBV ELITE Standard: STD020PLD
- › CPE Internal Control: CTRCPE
- › Molecular biology grade water

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole Blood	143 IU/mL - 10 cp/rxn	100% (34/34)*	100% (34/34)*
	Plasma	163 IU/mL - 10 cp/rxn	100% (30/30)*	96.8% (30/31)*

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

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

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
MagNA Pure 24	Whole Blood, Plasma	200 µL	350 µL	100 µL	20 µL diluted 1:2

Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments

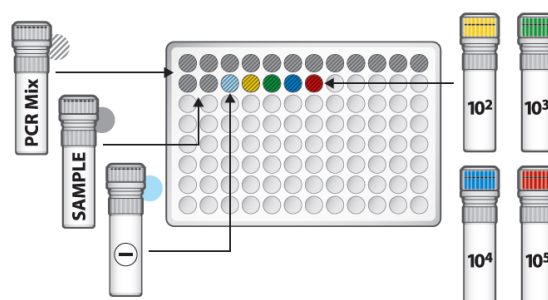
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "EBV" detector with "FAM (465 -510)".
3. Set "Internal Control" detector with "VIC (540 -580)".
4. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C

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

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

Amplification - PCR Set-up

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



Amplification - Threshold for qualitative analysis*

Instrument	Matrix	Background Fluorescence Level FAM	EBV FAM	Background Fluorescence Level VIC	Internal Control VIC
Cobas-Z 480 PCR instruments	Whole Blood	from cycle 2 to cycle 6	0.80	from cycle 6 to cycle 10	1.5
Cobas-Z 480 PCR instruments	Plasma	from cycle 2 to cycle 6	0.55	from cycle 6 to cycle 10	1.2

**manually set the Threshold and Noiseband*

Interpretation - Qualitative results

EBV Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	-	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The EBV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction. The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ copies/reaction or approximately from 250 to 2.5 10⁷ copies/mL.

FOLHA DE TRABALHO

[illegible]