



## NOTICE of CHANGE dated 29/09/2022

### IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

# «HSV1 ELITe MGB® Kit» Ref. RTS031PLD

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

- *Update for the use of the product for CSF matrix in association with «ELITe BeGenius®» instrument (REF INT040).*
- *Confirmed LoD and ULoQ/LLoQ value calculated on CSF matrix*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

## PLEASE NOTE

	LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT
	THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT
	CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT
	LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT
	A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT
	DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT



**HSV1 ELITE MGB® Kit**  
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

**PRINCÍPIOS DO ENSAIO**

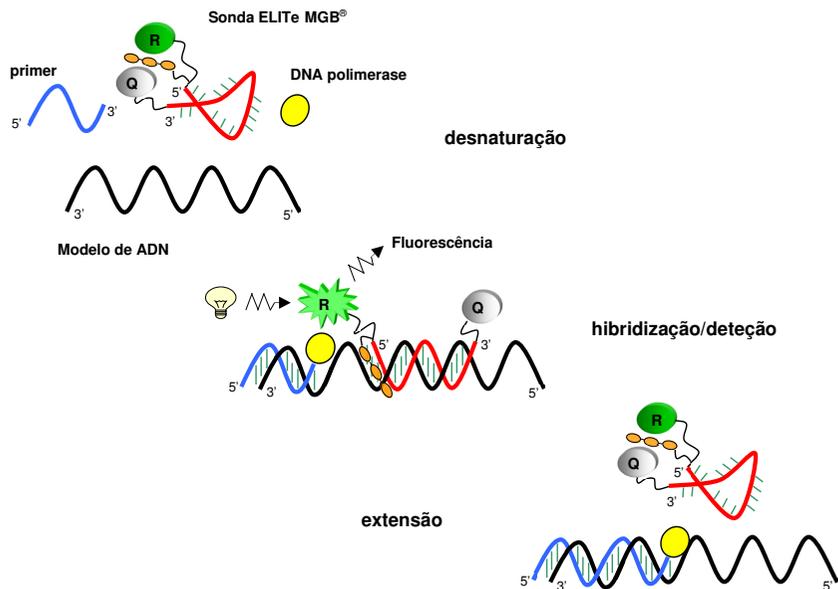
O ensaio consiste numa reação de amplificação em tempo real com um termóstato programável fornecido com um sistema ótico de detecção de fluorescência (termociclador de amplificação em tempo real).

Em cada poço, são realizadas duas reações de amplificação a partir do ADN extraído das amostras a serem testadas: uma reação específica para uma região da **glicoproteína D (gpD)** do HSV1 e uma reação específica para uma região do **gene da betaglobina humana** (controlo Interno da inibição). A sonda específica do HSV1 com tecnologia ELITE MGB®, etiquetada com fluoróforo FAM, é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação do HSV1. A sonda específica do Controlo Interno com tecnologia ELITE MGB®, etiquetada com fluoróforo AP525 (semelhante a VCI), é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação 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 HSV1 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 sinteticamente mostrado o mecanismo de ativação e a emissão de fluorescência da sonda da tecnologia 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.



**HSV1 ELITE MGB® Kit**  
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD



**ÍNDICE**

UTILIZAÇÃO PREVISTA	página 1
PRINCÍPIOS DO ENSAIO	página 2
DESCRIÇÃO DO PRODUTO	página 3
MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO	página 3
MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO	página 3
OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS	página 3
AVISOS E PRECAUÇÕES	página 5
ELITE INGENIUS®	página 6
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 6
PROCEDIMENTO	página 8
ELITE BEGENIUS®	página 15
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 15
PROCEDIMENTO	página 17
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DO ELITE InGenius® e ELITE BeGenius®	página 22
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System	página 31
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 31
PROCEDIMENTO	página 33
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	página 41
Roche cobas z 480 analyzer	página 47
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 47
PROCEDIMENTO	página 48
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	página 53
REFERÊNCIAS	página 55
LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	página 55
RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	página 56
SÍMBOLOS	página 59
NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	página 60

**UTILIZAÇÃO PREVISTA**

O produto «**HSV1 ELITE MGB® Kit**» é um ensaio qualitativo e quantitativo da amplificação de ácidos nucleicos para a **deteção e quantificação do ADN do vírus humano herpes simples tipo 1 (HSV1)** em amostras de ADN extraídas do líquido cefalorraquidiano (LCR), sangue total colhido em EDTA e plasma colhido em EDTA.

O produto destina-se para utilização no diagnóstico e monitorização de infeções de HSV1, junto com dados clínicos do doente e outros resultados de testes de laboratório.

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

**DESCRIÇÃO DO PRODUTO**

O produto «**HSV1 ELITe MGB Kit**» fornece a mistura completa pronta a usar HSV1 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** (processando pelo menos 2 amostras por sessão) em associação com o «**ELITe InGenius**» e o «**ELITe BeGenius**», e **25 testes** em associação com outros sistemas.

Os primers e a sonda específica do HSV1 (estabilizado pelo grupo MGB, etiquetado com fluoróforo FAM e extinto por uma molécula não fluorescente) são específicos para uma região do **gpD** do HSV1 (região US6).

Os primários e a sonda para o Controlo Interno (estabilizado com o grupo MGB, etiquetado por 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 nucleotídicos, 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 standards e controlos.

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
HSV1 Q - PCR Mix	Mistura de reação completa	4 x 540 µL	-

**MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO**

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

**OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS**

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

Para extração de ADN manual a partir de amostras a serem analisadas, está validada a utilização do kit de produtos genéricos «**EXTRAGEN**» (ELITechGroup S.p.A., ref. EXTG01) para a extração de ADN de amostras não celulares e do «**EXTRAblood**» (ELITechGroup S.p.A., ref. EXTB01), kit para a extração de ADN de amostras celulares e não celulares.

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

Para uma análise automática da amostra com o instrumento «**ELITe InGenius**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) são necessários os seguintes produtos genéricos: os cartuchos de extração «**ELITe InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200), os consumíveis para extração e amplificação de ácidos nucleicos a partir de amostras biológicas «**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, código 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 «**HSV1 ELITe STD**»,
- para o Positive Control da amplificação «**HSV1 ELITe PC**»,
- para o Negative Control da amplificação «**HSV1 ELITe NC**»,
- para a análise de amostras «**HSV1 ELITe\_WB\_200\_100**», «**HSV1 ELITe\_PL\_200\_100**» e «**HSV1 ELITe\_CSF\_200\_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 «**HSV1 ELITe\_Be\_STD**»,
- para o Positive Control da amplificação «**HSV1 ELITe\_Be\_PC**»,
- para o Negative Control da amplificação «**HSV1 ELITe\_Be\_NC**»,
- para a análise de amostras «**HSV1 ELITe\_Be\_WB\_200\_100**», «**HSV1 ELITe\_Be\_PL\_200\_100**» e «**HSV1 ELITe\_Be\_CSF\_200\_100**».

Para extração de ADN automática das amostras a serem analisadas, é validada a utilização do produto genérico «**ELITe STAR 200 Extraction Kit**» (ELITechGroup S.p.A., Ref. INT011EX), kit para extração de 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 do ADN e ARN de amostras não celulares e celulares com o instrumento «**ELITe GALAXY**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT020).

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

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.

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

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

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

Quando for usado um 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, é necessário o uso do produto genérico:

«**MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL**» (Life Technologies, ref. 4346906), microplacas com poços 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 HSV1 para análise qualitativa, use o produto «**HSV1 - ELITe Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR031PLD) ou o produto «**HSV1 - ELITe Positive Control RF**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR031PLD-R), positive control de ADN de plasmídeo.

Se for necessária a deteção e quantificação de ADN de HSV1 para análise quantitativa, use o produto «**HSV1 ELITe Standard**» (ELITechGroup S.p.A., ref. STD031PLD), quatro diluições de ADN de plasmídeo de quantidade conhecida para obter a curva padrão.

**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 bases devem ser neutralizados antes da eliminação.

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

Nunca deve pipetar soluções com a boca.

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

Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.

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

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

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

Não utilize o produto após a data de validade indicada.

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

Não use reagentes de lotes diferentes.

Não use reagentes de outros fabricantes.

**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.

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

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

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

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

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

**Avisos e precauções específicos para os componentes**

A **HSV1 Q - PCR Mix** deve ser guardada a -20 °C num local escuro.

A **HSV1 Q - PCR Mix** pode ser congelada e descongelada para um máximo de **cinco vezes**: quaisquer ciclos de congelação/descongelação adicionais podem causar um menor desempenho do produto.

A **HSV1 Q - PCR Mix** pode ser utilizada para 5 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada (modo de execução "Extraction+PCR") ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada (modo de execução "Extraction+PCR").

**ELITe InGenius****AMOSTRAS E CONTROLOS****Amostras**

Este produto deve ser utilizado com as seguintes amostras clínicas:

**Sangue total colhido em EDTA**

As amostras de sangue total para extração de 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 a extração de ADN de sangue total for realizada com o **ELITe InGenius Software** versão 1.3 (ou versões equivalentes mais recentes), use os protocolos de extração **HSV1 ELITe WB\_200\_100**. Este protocolo processa 200 µL de amostra, adiciona o **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

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

**Plasma colhido em EDTA**

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

Recomenda-se a separação das amostras 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.

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

**Nota:** quando a extração de ADN do plasma for realizada com o **ELITe InGenius** e com o **ELITe InGenius Software** versão 1.3 (ou versões equivalentes mais recentes), use os protocolos de extração **HSV1 ELITe\_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.

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

**Note:** quando a extração de ADN a partir de sangue total for realizada com o **ELITe InGenius** e o **ELITe InGenius** versão 1.3 (ou versões equivalentes posteriores), utilize os protocolos de extração **HSV1 ELITe\_CSF\_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.

**Outras amostras:**

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

**Substâncias interferentes**

A amostra não deve conter heparina, para evitar problemas de inibição e a possibilidade de resultados inválidos frequentes.

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

**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 **HSV1 ELITe Standard**, em associação com o protocolo «**HSV1 ELITe STD**»,

como positive control da amplificação, use o **HSV1 - ELITe Positive Control** em associação com o protocolo «**HSV1 ELITe\_PC**,

como negative control da amplificação, use água de qualidade molecular (não fornecida com este kit) em associação com o protocolo «**HSV1 ELITe\_NC**».

**Nota:** O sistema **ELITe InGenius** requer resultados aprovados e válidos da curva de calibração e dos controlos da amplificação para cada lote de reagente de amplificação guardado na respetiva base de dados. As curvas da calibração, aprovadas e guardadas na base de dados, irão expirar após **60 dias**. Na data de fim da validade será necessário fazer uma nova execução dos Q-PCR Standards em associação com o lote do reagente de amplificação.

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

Para além disso, os calibradores e os controlos da amplificação devem ser novamente executados quando:

- for iniciado um novo lote de reagentes,
- os resultados da análise de controlo da qualidade (ver o parágrafo seguinte) se encontrarem fora da especificação,
- for realizado qualquer serviço de manutenção significativo no instrumento **ELITe InGenius**.

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

**Controlos da qualidade**

É recomendada a validação planeada do procedimento de extração e amplificação. Podem ser usadas amostras testadas ou material de referência certificado. Os controlos externos devem ser usados em conformidade com as organizações de acreditação locais, estatais e federais, consoante aplicável.

**PROCEDIMENTO**

O procedimento para utilização do «**HSV1 - ELITe MGB Kit**» com o sistema **ELITe InGenius** consiste em três passos:

- Verificação da prontidão do sistema,
- Preparação da sessão,
- Revisão e exportação 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 de início de sessão “**CLOSED**” (Fechado);

- certificar-se de que os Calibradores (**HSV1 Q-PCR Standard**) foram executados, aprovados e não estão expirados (Estado) em associação com o lote do reagente de amplificação a ser usado. Pode verificar esta situação no menu “Calibração” na página inicial. Se não existirem Calibradores aprovados ou válidos, execute-os como descrito nos parágrafos seguintes,

- certificar-se de que os controlos da amplificação (**HSV1 - Positive Control**, **HSV1 Negative Control**) foram executados, aprovados e não estão expirados (Estado) em associação com o lote do reagente de amplificação a ser usado. Pode verificar esta situação no menu “Controlo” na página inicial. Se não existirem controlos da amplificação aprovados ou válidos, execute-os como descrito nos parágrafos seguintes,

- 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 as matrizes citadas.

Os Protocolos de ensaio disponíveis para o «**HSV1 ELITe MGB Kit**» estão descritos na tabela seguinte.

Protocolos de ensaio para o HSV1 ELITe MGB Kit e o ELITe InGenius			
Nome	Matriz	Unidade do relatório	Características
HSV1 ELITe_WB_200_100	Sangue Total	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
HSV1 ELITe_PL_200_100	Plasma	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

<b>HSV1 ELITe_CSF_200_100</b>	LCR	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
-------------------------------	-----	-----------	--

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 produto **HSV1 ELITe MGB Kit** pode ser usado com o sistema **ELITe InGenius** para realizar:

- Execução integrada (Extract + PCR) (Extração + PCR),
- Execução de amplificação (PCR Only) (apenas PCR),
- Execução da calibração (PCR Only) (apenas PCR),
- Execução de amplificação para execução de Positive e Negative Control (PCR only) (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 descritos nos parágrafos seguintes os passos principais para a preparação dos três tipos de execução.

#### A. Execução integrada

Para configurar uma execução integrada com extração e amplificação da amostra, execute os passos seguintes de acordo com a GUI:

- Descongele os tubos da **HSV1 Q - PCR Mix** à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos em número suficiente para a sessão. Cada tubo é suficiente para 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

**Nota:** Descongele o **HSV1 Q - PCR Mix** num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

- Descongele os tubos CPE à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos 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".
- Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" é de 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" (por ex., HSV1 ELITe\_PL\_200\_100).
- Certifique-se de que o "Protocol" apresentado é: "Extract + PCR" (Extração + PCR).
- Selecione a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position":  
se for usado um tubo primário, selecione "Tubo primário",  
se for usado um tubo secundário, selecione "Extraction Tube".  
Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a HSV1 Q-PCR Mix no "Inventory Block" selecionado pela seguinte instrução da GUI e preencha o número do lote e a data de validade do HSV1 Q - PCR Mix and CPE. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.

- Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
- Carregue as "PCR Cassettes", os cartuchos de extração "ELITe InGenius SP 200", todos os consumíveis necessários e as amostras a serem extraídas, 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 aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

**Nota:** No final da execução a restante amostra extraída no "Tubo de eluição" deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 °C. Evite derramar a amostra extraída.

**Nota:** No final da execução, as PCR Cassettes com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem produzirem contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

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

#### B. Execução da amplificação

Para preparar a execução de amplificação a iniciar a partir de ADN extraído, realize os passos seguintes de acordo com a GUI:

- Descongele um número suficiente de tubos da **HSV1 Q - PCR Mix** à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos para a sessão. Cada tubo é suficiente para 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

**Nota:** Descongele o **HSV1 Q - PCR Mix** num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

- Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
- Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Extraction Input Volume" é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" é de 100 µL.
- Para cada Rastreo de interesse preencha a SID digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
- Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (por ex., HSV1 ELITe\_PL\_200\_100).
- Selecione "PCR Only" (apenas PCR) na coluna "Protocol".
- Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" é "Elution Tube (fila inferior)". Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a HSV1 Q-PCR Mix no "Inventory Block" selecionado pela seguinte instrução da GUI e preencha o número do lote e a data de validade do HSV1 Q - PCR Mix. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
- Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue as "PCR Cassettes" e as amostras de Ácido nucleico extraídas 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 sistema **ELITe InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

**Nota:** No final da execução a restante amostra extraída no "Elution tube" deve ser removida do instrumento, tapada e guardada a -20 °C durante um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

**Nota:** No final da execução, as PCR Cassettes com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem produzirem contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

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

**Execução de calibração**

Para configurar a execução de Calibração para Q-PCR Standards, execute os passos seguintes de acordo com a GUI:

1. Descongele os tubos da **HSV1 Q - PCR Mix** à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos em número suficiente para a sessão. Cada tubo é suficiente para 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

**Nota:** Descongele o **HSV1 Q - PCR Mix** num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

2. Descongele os tubos **HSV1 Q-PCR Standard** (Cal1: HSV1 Q-PCR Standards 10<sup>2</sup>, Cal2: HSV1 Q-PCR Standards 10<sup>3</sup>, Cal3: HSV1 Q-PCR Standards 10<sup>4</sup>, Cal4: HSV1 Q-PCR Standards 10<sup>5</sup>) à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
4. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Extraction Input Volume" é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" é de 100 µL.
5. No Rastreo de interesse, selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay".
6. Selecione o Protocolo do ensaio "HSV1 ELITe\_STD" na coluna "Assay" (Ensaio) e preencha o número do lote e a data de validade do HSV1 Q-PCR Standard.
7. Clique em "Next" para continuar a preparação.
8. Carregue a HSV1 Q-PCR Mix no "Inventory Block" selecionado pela seguinte instrução da GUI e preencha o número do lote e a data de validade do HSV1 Q - PCR Mix. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue as "PCR Cassettes", os tubos **HSV1 Q-PCR Standard** 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 sistema ELITe InGenius permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

**Nota:** No final da execução a restante amostra extraída no "Elution tube" deve ser removida do instrumento, tapada e guardada a -20 °C durante um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

**Nota:** No final da execução, as PCR Cassettes com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem produzirem contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

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

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

**C. Execução de amplificação para Controlo Positivo e Controlo Negativo**

Para preparar a execução de amplificação para o Positive Control e Negative Control, realize os passos seguintes em conformidade com a GUI:

1. Descongele um número suficiente de tubos da **HSV1 Q - PCR Mix** à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos para a sessão. Cada tubo é suficiente para 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

**Nota:** Descongele o **HSV1 Q - PCR Mix** num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

2. Descongele os tubos de **HSV1 - Positive Control** à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos para a sessão de amplificação do controlo positivo. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Transfira pelo menos 50 µL da água de qualidade para biologia molecular para as sessões num tubo Eluição, fornecido com o ELITe InGenius SP Consumable Set.
4. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
5. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Volume de entrada de extração" é de 200 µL e que o "Volume de eluição extraído" é de 50 µL.
6. No Rastreo de interesse, selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay".
7. Para o positive control, selecione o Protocolo de ensaio "HSV1 ELITe\_PC" na coluna "Assay" e preencha o número do lote e a data de validade do HSV1 Positive Control.
8. Para o controlo negativo, selecione o Protocolo de ensaio "HSV1 ELITe\_NC" e preencha o número do lote e a data de validade da água de qualidade para biologia molecular.
9. Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue a HSV1 Q-PCR Mix no "Inventory Block" selecionado pela seguinte instrução da GUI e preencha o número do lote e a data de validade do HSV1 Q - PCR Mix. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue/verifique os racks para pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
12. Carregue as "PCR Cassettes", o tubo Controlo positivo HSV1 e o tubo de controlo negativo 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 InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

**Nota:** O Controlo positivo deve ser executado como controlo da amplificação, para preparar o Gráfico de controlo. São necessários quatro (4) valores de Controlo positivo, de 4 execuções diferentes, para preparar o gráfico. Após isso, os valores do Controlo positivo são usados para monitorização do passo de amplificação. Consulte o manual do utilizador do instrumento para obter mais informações.

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

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

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

**Revisão e aprovação de resultados**

No final da execução, é automaticamente apresentado o ecrã "Results Display". Neste ecrã são mostrados os resultados da amostra/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"). Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

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

O **ELITE InGenius** gera os resultados utilizando o produto «**HSV1 ELITe MGB Kit**» através do seguinte procedimento:

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

**A. Validação da Curva de calibração**

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda HSV1 específica ("HSV1") nas reações de amplificação do Calibrador são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos no protocolo de ensaio "HSV1 ELITE\_STD".

A Curva de calibração, específica para o lote de reagente de amplificação, é guardada na base de dados (Calibração). Pode ser visualizada e aprovada por pessoal qualificado como o "Administrator" ou "Analyst", seguindo as instruções na GUI.

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

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

**Nota:** se a curva de calibração for executada em conjunto com amostras e o respetivo resultado for inválido, as amostras não são quantificadas e não pode ser aprovada. Neste caso, também deve ser repetida a amplificação de todas as amostras.

**B. Validação dos resultados do Controlo Positivo e Controlo Negativo da amplificação**

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda específica HSV1 ("HSV1") na sonda de controlo interno específica ("CI") e 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 "HSV1 ELITE\_PC" e "HSV1 ELITE\_NC".

Os resultados da amplificação do Positive Control e Negative Control, específicos para o lote de reagente de amplificação usado, são registados na base de dados (Controlos). Podem ser visualizados e aprovados por pessoal qualificado como o "Administrator" ou "Analyst", seguindo as instruções na GUI.

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

Antes de analisar qualquer amostra, é absolutamente obrigatório certificar-se de que o Controlo positivo e Controlo negativo da amplificação foram executados com o lote do reagente de amplificação a ser usado e que os resultados estão aprovados e válidos. A disponibilidade de resultados do Controlo positivo e Controlo negativo da amplificação "Aprovados" (Estado) é mostrada na janela "Controlos" da GUI. Se os resultados da amplificação de Controlo positivo e Controlo negativo estiverem em falta, crie os mesmos da forma acima descrita.

Os resultados das execuções de amplificação de Controlo positivo e Controlo negativo são usados pelo software do instrumento para calcular a preparação dos "Gráficos de controlo". São necessários quatro resultados de Controlo positivo e Controlo negativo, de quatro execuções diferentes, para preparar o "Gráfico de controlo". Após isso, os resultados do Positive Control e Negative Control são usados para monitorização dos desempenhos do passo de amplificação. Consulte o manual do utilizador do instrumento para obter mais informações.

**Nota:** se o resultado do Controlo positivo ou Controlo negativo da amplificação não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem "Falhou" no ecrã "Controlos" e não é possível aprovar o mesmo. Neste caso, foi repetida a reação do Positive Control ou Negative Control da amplificação.

**Nota:** se o Positive Control ou o Negative Control for executado em conjunto com amostras a serem testadas e o respetivo resultado for inválido, as amostras podem ser aprovadas mas os resultados não são válidos. Neste caso, também deve ser repetida a amplificação de todas as amostras.

**C. Validação dos resultados das amostras**

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda HSV1 específica (FAM, Canal "HSV1") e pela sonda de controlo interno específica (Canal "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.

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 Positive e Negative Control em conjunto com os Calibradores. A disponibilidade de resultados da Curva de calibração e de positive control e negative control da amplificação com "Approved" (Estado) é mostrada nas janelas "Calibration" (Calibração) e "Controls" (Controlos) do software ELITE InGenius, sendo comunicada na secção "Assay Parameters" (Parâmetros do ensaio).

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
HSV1 Q - PCR Standard	APROVADO
2) Positive Control	Estado
HSV1 - Positive Control	APROVADO
3) Negative Control	Estado
HSV1 - Negative Control	APROVADO

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

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

Resultado da execução da amostra	Interpretação
HSV1: ADN detetado, quantidade igual a XXX cópias/mL	<b>ADN HSV1 detetado</b> no intervalo de medição do ensaio, quantidade como mostrado.
HSV1: ADN detetado, quantidade inferior a LLoQ cópias/mL	<b>ADN HSV1 detetado</b> abaixo do limite inferior de quantificação do ensaio
HSV1: ADN detetado, quantidade além de ULQ cópias/mL	<b>ADN HSV1 detetado</b> além do limite superior de quantificação do ensaio
HSV1: ADN não detetado ou inferior a LoD cópias/mL	<b>ADN HSV1 não detetado ou abaixo do limite de deteção</b> do ensaio.
Inválido - Voltar a testar a amostra	<b>Resultado do ensaio não válido</b> devido a falha do Controlo Interno (Extração incorreta ou presença de inibidor).

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

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

Amostras reportadas como "HSV1: DNA Not Detected or below LoD" (ADN não detetado ou inferior ao LoD) são adequadas para análise mas não foi possível detetar ADN de HSV1. Neste caso não pode excluir-

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

se que o ADN de HSV1 está presente a uma concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver "desempenho e características").

As amostras positivas de HSV1 a uma concentração inferior ao LdD, quando forem detetadas pelo ensaio, são comunicadas como "HSV1: ADN detetado, quantidade inferior ao LLoQ" (consulte "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 "Sample Report" e "Track Report".

**D. Elaboração do relatório do resultado das amostras**

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

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

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

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

ELITe BeGenius

AMOSTRAS E CONTROLOS

**Amostras**

Este produto deve ser utilizado com as seguintes amostras clínicas:

**Sangue total colhido em EDTA**

As amostras de sangue total para extração de 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 a extração de ADN do sangue total é realizada com o **ELITe BeGenius** e com o **software ELITe BeGenius** versão **2.0.0** (ou versões equivalentes posteriores), use o protocolo de extração **HSV1 ELITe Be\_WB\_200\_100** Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o controlo interno de **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

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

**Plasma colhido em EDTA**

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

Recomenda-se a separação das amostras 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 a partir de 200 µL de plasma for realizada com o **ELITe BeGenius** e o **software ELITe BeGenius** versão **2.0.0** (ou versões posteriores equivalentes), utilize o protocolo de extração **HSV1 ELITe Be\_PL\_200\_100** Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o controlo interno de

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

**CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

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

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

**Nota:** quando a extração de ADN a partir de sangue total for realizada com o **ELITe BeGenius** e o **ELITe BeGenius** versão **2.0.0** (ou versões posteriores equivalentes), utilize os protocolos de extração **HSV1 ELITe Be\_CSF\_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.

**Outras amostras:**

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

**Substâncias interferentes**

A amostra não deve conter heparina, para evitar problemas de inibição e a possibilidade de resultados inválidos frequentes.

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

**Calibradores da amplificação e controlos da amplificação**

Antes da análise de 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 **HSV1 ELITe Standard**, em associação com o protocolo «**HSV1 ELITe Be STD**», como positive control da amplificação, use o **HSV1 - ELITe Positive Control**, em associação com o protocolo «**HSV1 ELITe Be PC**», como negative control da amplificação, use água de qualidade molecular (não fornecida com este kit) em associação com o protocolo «**HSV1 ELITe Be NC**».

**Nota:** o **ELITe BeGenius** com o **software ELITe BeGenius®** 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 Positive e Negative Controls.

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

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

**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**

O procedimento para utilização do «HSV1 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:

- ligue o **ELITe BeGenius** e selecione o modo “CLOSED” (Fechado);
- verificar se os Calibradores (**HSV1 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 (**HSV1 - Positive Control, HSV1 Negative Control**) foram executados, aprovados e não estão expirados (estado). Pode verificar esta situação no menu “Controlo” na página inicial;
- escolher o tipo de execução e preparar a mesma, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pelo ELITechGroup. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os kits ELITe MGB, matrizes e o instrumento ELITe BeGenius®.

Os Protocolos de ensaio disponíveis para o «HSV1 ELITe MGB Kit» estão descritos na tabela seguinte.

Protocolos de ensaio para o «HSV1 ELITe MGBKit» e o ELITe InGenius			
Nome	Matriz	Unidade do relatório	Características
HSV1 ELITe_Be_WB_200_100	Sangue Total	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
HSV1 ELITe_Be_PL_200_100	Plasma	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
HSV1 ELITe_Be_CSF_200_100	LCR	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

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

**Preparação da sessão**

O **HSV1 ELITe MGB Kit** em associação com o **ELITe BeGenius** pode ser usado para:

- A. Execução da amostra (Extraction + PCR),
- B. Execução de amplificação (PCR Only) (apenas PCR)
- C. Execução da calibração (PCR only) (apenas PCR),
- D. Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only).

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

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

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

**A. Execução da amostra**

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

1. Descongele um número suficiente de tubos da HSV1 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 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.
3. Selecione “Perform Run” a partir do ecrã “Home screen”.
4. Retire os Suportes da “Cooler Unit” e coloque-os na mesa de preparação.
5. Selecione o “run mode”: “Extract + PCR” (Extração + PCR).
6. Carregue as amostras nos Racks 5 e 4 (comece sempre com o Rack 5).
7. Insira o suporte na “Cooler Unit”. Clique em “Next” para continuar a preparação.

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

8. Verifique o Volume de entrada de extração (200 µL) e o Volume de eluição extraído (100 µL).
9. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna “Assay” (isto é, HSV1 ELITe\_Be\_WB\_200\_100). Clique em “Next” para continuar a preparação.
10. Se usado, repita os passos 7 a 9 para o Rack 4.
11. Carregue os tubos de eluato nos Racks 3 e 2 (comece sempre com o Rack 3).

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

12. Insira o suporte na “Cooler Unit”. Clique em “Next” para continuar a preparação.
13. Se usado, repita o passo 12 para o Rack 2.
14. Carregue o CPE e a HSV1 Q-PCR Mix no Rack 1.
15. Insira o Rack 1 na “Cooler Unit”. Clique em “Next” para continuar a preparação.
16. Carregue e verifique os Suportes de pontas na “Inventory Area” (Área de inventário) seguindo as instruções na GUI. Clique em “Next” para continuar a preparação.
17. Carregue o Cesto com “PCR Cassette” na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em “Next” para continuar a preparação.
18. Carregue o Cesto com os cartuchos de extração “ELITe InGenius SP 200” e os consumíveis de extração necessários seguindo as instruções na GUI. Clique em “Next” para continuar a preparação.
19. Feche a porta do instrumento.
20. Pressione “Start” para iniciar a execução.

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

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

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

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

### B. Execução da amplificação

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

1. Descongele um número suficiente de tubos da HSV1 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 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.
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 as amostras nos Racks 3 e 2 (comece sempre com o Rack 3).
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" (por ex., HSV1 ELITe\_Be\_WB\_200\_100). Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Repita os passos 7 a 9 para o Rack 2.
11. Carregue o CPE e a HSV1 Q-PCR Mix no Rack 1.
12. Insira o Rack 1 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
13. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
14. Carregue o Cesto 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 a restante Amostra extraída pode ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 °C. Evite derramar a Amostra extraída.

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

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

### C. Execução de calibração

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

1. Descongele um número suficiente de tubos da HSV1 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 HSV1 Q - PCR Standard (Cal1: HSV1 Q-PCR Standards 10<sup>2</sup>, Cal2: HSV1 Q-PCR Standard 10<sup>3</sup>, Cal3: HSV1 Q-PCR Standards 10<sup>4</sup>, Cal4: HSV1 Q-PCR Standards 10<sup>5</sup>). 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 nos Racks 3.
7. Selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (HSV1 ELITe\_Be\_STD). Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
8. Carregue a HSV1 Q-PCR Mix no Rack 2.
9. Insira o Rack 2 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue o Cesto com "PCR Cassette" na Área de inventário 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 BeGenius permite ao utilizador ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

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

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

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

### Execução de Positive Control e Negative Control

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

1. Descongele um número suficiente de tubos da HSV1 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 HSV1 - ELITe Positive Control, para amplificação de Positive Control. 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 nos Racks 3.

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

8. Selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (por ex., (HSV1 ELITe\_Be\_PC e HSV1 ELITe\_Be\_NC). Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue a HSV1 Q-PCR Mix no Rack 2.
10. Insira o Rack 2 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
12. Carregue o Cesto com "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, o restante Positive Control pode ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C. Evite derramar os Positive Controls.

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

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

**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 HSV1 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.

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

**CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO  
ELITe InGenius e ELITe BeGenius****Sensibilidade analítica: Limite de deteção**

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

O LoD deste ensaio foi testado usando o ADN de plasmídeo que contém o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. 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 24 réplicas (modo de "PCR only") a realizarem a amplificação por produtos ELITechGroup S.p.A. em dois instrumentos diferentes.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Amostra	N	Válido	Positivo	Negativo
10 cópias de ADN de plasmídeo + 500 ng de ADN genómico humano	24	24	24	0

O Limite de deteção (LoD) do HSV1 ELITe MGB Kit foi verificado em associação com amostras de **Sangue Total** colhido em EDTA, **Plasma** colhido em EDTA e **LCR** e os sistemas **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** (modo Extr + PCR).

**Para Sangue Total:**

O LoD deste ensaio foi verificado através de testes a 20 réplicas de amostras de sangue total reforçadas com 211 cópias/mL nos sistemas ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® no modo "Extract + PCR". As amostras foram reforçadas com material de referência, fluido de cultura inativado por calor de vírus de herpes simples tipo 1 (HSV-1) (ZeptoMetrix Corporation).

O LoD é confirmado se, pelo menos, 18 em 20 réplicas derem resultado positivo em conformidade com a diretriz CLSI EP17-A.

Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de sangue completo e ELITe InGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
Sangue total colhido em EDTA	211 cópias/mL	20	20	19	1

Limite de deteção para amostras de sangue completo e ELITe BeGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
Sangue total colhido em EDTA	211 cópias/mL	20	20	20	0

O valor de LoD para o alvo HSV1 foi confirmado a 211 IU/mL para sangue total colhido em EDTA.

**Para Plasma:**

O LoD deste ensaio foi verificado através de testes a 20 réplicas de amostras de plasma reforçadas com 250 cópias/mL nos sistemas ELITe InGenius e ELITe BeGenius no modo "Extract + PCR". As amostras foram reforçadas com material de referência, fluido de cultura inativado por calor de vírus de herpes simples tipo 1 (HSV-1) (ZeptoMetrix Corporation).

O LoD é confirmado se, pelo menos, 18 em 20 réplicas derem resultado positivo em conformidade com a diretriz CLSI EP17-A.

Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de plasma e ELITe InGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
Plasma colhido em EDTA	250 cópias/mL	20	20	20	0

Limite de deteção para amostras de plasma e ELITe BeGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
Plasma colhido em EDTA	250 cópias/mL	20	20	20	0

O valor de LoD para o alvo HSV1 foi confirmado a 250 IU/mL para plasma colhido em EDTA.

**Para o líquido cefalorraquidiano (LCR):**

O LoD deste ensaio foi verificado através de testes a 20 réplicas de amostras de LCR reforçadas com 250 cópias/mL nos sistemas ELITE InGenius e ELITE BeGenius no modo "Extract + PCR". As amostras foram reforçadas com material de referência, fluido de cultura inativado por calor de vírus de herpes simples tipo 1 (HSV-1) (ZeptoMetrix Corporation).

O LoD é confirmado se, pelo menos, 18 em 20 réplicas derem resultado positivo em conformidade com a diretriz CLSI EP17-A.

Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de detecção para amostras de LCR e ELITE InGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
Líquido cefalorraquidiano	250 cópias/mL	20	20	20	0

Limite de detecção para amostras de LCR e ELITE BeGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
Líquido cefalorraquidiano	250 cópias/mL	20	20	20	0

O valor do LdD para o alvo HSV1 foi confirmado a 250 IU/mL para líquido cefalorraquidiano.

**Intervalo de medição linear e Limites de quantificação**

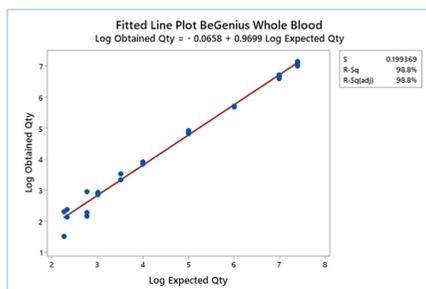
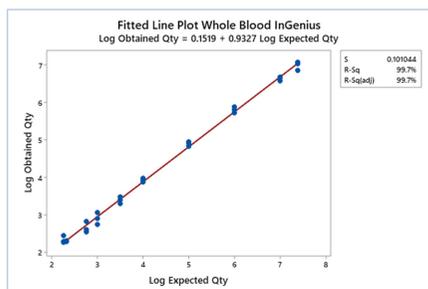
O intervalo de medição linear do HSV1 ELITE MGB Kit usado em associação com **Sangue Total** colhido em EDTA, **Plasma** colhido em EDTA e **LCR** e o **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** foi verificado com um painel de diluições de HSV1. O painel foi preparado através da diluição de fluido de cultura inativado por calor de vírus de herpes simples tipo 1 (HSV-1) (ZeptoMetrix Corporation) em matrizes negativas para ADN de HSV1.

**Para Sangue Total:**

O painel era constituído por dez pontos de diluição a partir de cerca de  $2,5 \times 10^7$  cópias/mL a cerca de 178 cópias/mL. Cada amostra do painel foi testada em 3 réplicas.

A análise dos dados obtidos, realizada por análise da regressão linear, demonstrou que o ensaio, em associação com amostras de sangue total, mostra uma resposta linear para todas as diluições com um coeficiente de correlação quadrado (R<sup>2</sup>) igual a 0,997 para o **ELITE InGenius** e 0,988 para o **ELITE BeGenius**.

Os resultados são comunicados nos gráficos seguintes.



O Limite inferior de quantificação (LIdQ) foi definido à concentração do LdD que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,253 Log cópias/mL para o **ELITE InGenius** e 0,305 Log cópias/mL para o **ELITE BeGenius**) e exatos (Bias igual a 0,133 Log cópias/mL para o **ELITE InGenius** e 0,491 Log cópias/mL para o **ELITE BeGenius**): 211 cópias/mL.

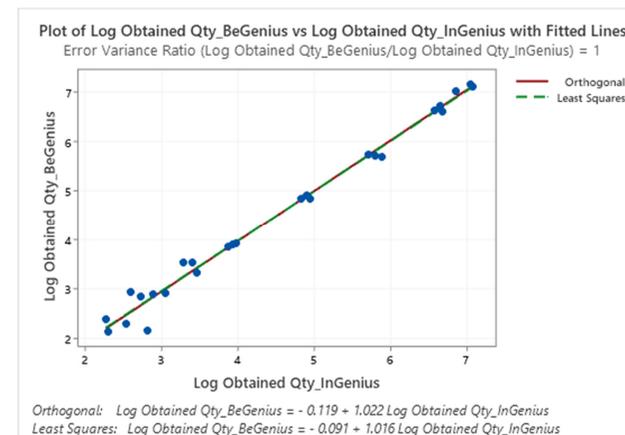
O Limite superior de quantificação (LSdQ) foi definido à concentração mais alta testada que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,117 Log cópias/mL para o **ELITE InGenius** e 0,068 Log cópias/mL para o **ELITE BeGenius**) e exatos (Bias igual a 0,393 Log cópias/mL para o **ELITE InGenius** e 0,297 Log cópias/mL para o **ELITE BeGenius**): 25.000.000 cópias/mL.

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear para amostras de Sangue Total e o ELITE InGenius e ELITE BeGenius		
Unidade de medida	limite inferior	limite superior
<b>cópias/mL</b>	<b>211</b>	<b>25.000.000</b>

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

Os resultados estão resumidos na figura seguinte.



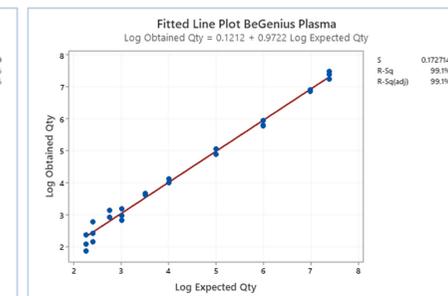
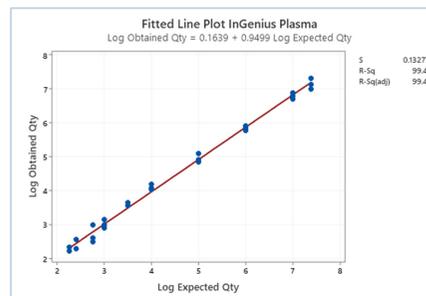
Neste teste, a análise da regressão ortogonal gerou um declive igual a 1,022 (95% CI: 0,977 - 1,067) e uma interceção igual a -0,119 (95% CI: -0,333; 0,094). A análise de regressão linear gerou um R<sup>2</sup> de 0,988.

**Para Plasma:**

O painel era constituído por dez pontos de diluição a partir de cerca de  $2,5 \times 10^7$  cópias/mL a cerca de 178 cópias/mL. Cada amostra do painel foi testada em 3 réplicas.

A análise dos dados obtidos, realizada por análise da regressão linear, demonstrou que o ensaio, em associação com amostras de sangue total, mostra uma resposta linear para todas as diluições com um coeficiente de correlação quadrado (R<sup>2</sup>) igual a 0,994 para o **ELITE InGenius** e 0,991 para o **ELITE BeGenius**.

Os resultados são comunicados nos gráficos seguintes.



**HSV1 ELITe MGB® Kit**  
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

O Limite inferior de quantificação (LIdQ) foi definido à concentração do LdD que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,192 Log cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,270 Log cópias/mL para o **ELITe BeGenius**) e exatos (Bias igual a 0,197 Log cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,163 Log cópias/mL para o **ELITe BeGenius**): 250 cópias/mL.

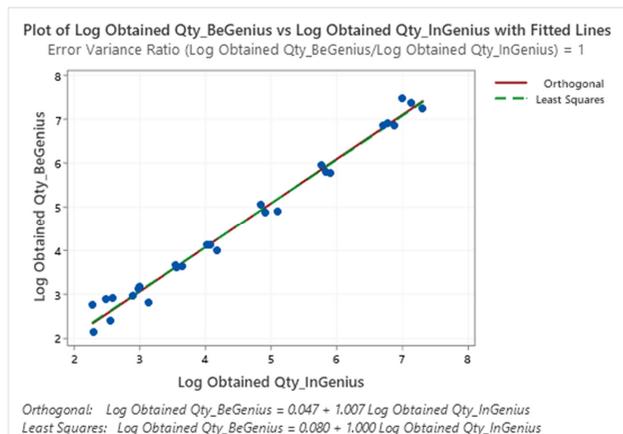
O Limite superior de quantificação (LSdQ) foi definido à concentração mais alta testada que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,117 Log cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,068 Log cópias/mL para o **ELITe BeGenius**) e exatos (Bias igual a 0,393 Log cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,297 Log cópias/mL para o **ELITe BeGenius**): 25.000.000 cópias/mL.

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear para amostras de plasma e o ELITe InGenius e ELITe BeGenius		
Unidade de medida	limite inferior	limite superior
<b>cópias/mL</b>	<b>250</b>	<b>25.000.000</b>

Os resultados obtidos pelo **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** e os métodos de referência foram analisados por regressão ortogonal e linear para calcular a correlação entre os métodos.

Os resultados estão resumidos na figura seguinte.



Neste teste, a análise da regressão ortogonal gerou um declive igual a 1,007 (95% CI: 0,960; 1,054) e uma interceção igual a 0,047 (95% CI: - 0,180; 0,274). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0,986.

**Para o líquido cefalorraquidiano LCR:**

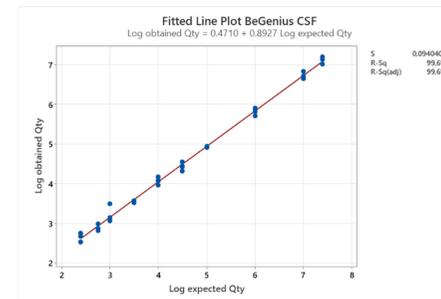
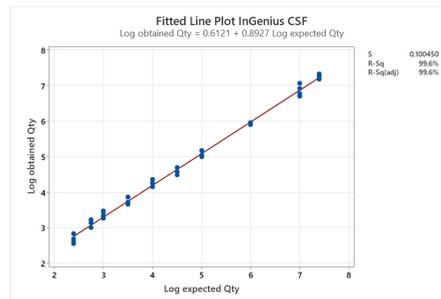
O painel era constituído por dez pontos de diluição a partir de cerca de  $2,5 \times 10^7$  cópias/mL a cerca de 250 cópias/mL. Cada amostra do painel foi testada em 4 réplicas.

A análise dos dados obtidos, realizada por análise da regressão linear, demonstrou que o ensaio, em associação com amostras de LCR, mostra uma resposta linear para todas as diluições com um coeficiente de correlação quadrado (R2) igual a 0,996 para o **ELITe InGenius** e 0,996 para o **ELITe BeGenius**.

Os resultados são comunicados nos gráficos seguintes.

**HSV1 ELITe MGB® Kit**  
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD



O Limite inferior de quantificação (LIdQ) foi definido à concentração do LdD que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,1209 Log cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,0941 Log cópias/mL para o **ELITe BeGenius**) e exatos (Bias igual a 0,2680 Log cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,2527 Log cópias/mL para o **ELITe BeGenius**): 250 cópias/mL.

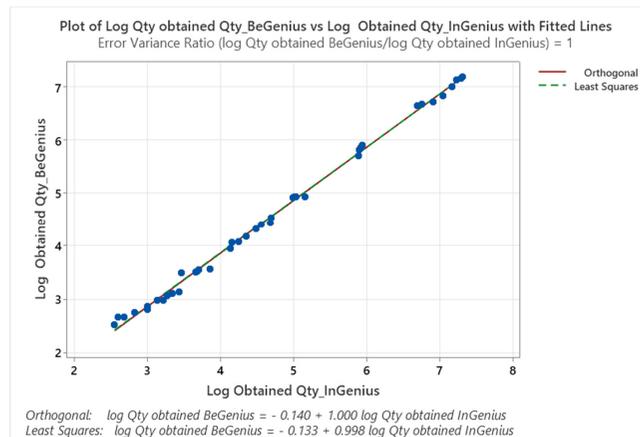
O limite superior de quantificação (LSdQ) foi definido à concentração mais alta testada que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,0661 Log cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,0811 Log cópias/mL para o **ELITe BeGenius**) e exatos (Bias igual a 0,1434 Log cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,2804 Log cópias/mL para o **ELITe BeGenius**): 25.000.000 cópias/mL.

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear para amostras de LCR e o ELITe InGenius e ELITe BeGenius		
Unidade de medida	limite inferior	limite superior
<b>cópias/mL</b>	<b>250</b>	<b>25.000.000</b>

Os resultados obtidos pelo **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** e os métodos de referência foram analisados por regressão ortogonal e linear para calcular a correlação entre os métodos.

Os resultados estão resumidos na figura seguinte.



Neste teste, a análise da regressão ortogonal gerou um declive igual a 1,000 (95% CI: 0,982; 1,016) e uma interceção igual a 0,140 (95% CI: - 0,223; 0,056). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0,997.

**Repetibilidade**

A Repetibilidade dos resultados obtidos pelo produto HSV1 ELITe MGB Kit em associação com os sistemas **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** foi testada através da análise de um painel de amostras de Sangue Total colhido em EDTA. O painel incluiu uma amostra negativa e duas amostras reforçadas com material de referência certificado de HSV1 (fluido de cultura inativado por calor, vírus de herpes simples tipo 1 (HSV-1), ZeptoMetrix Corporation) a uma concentração de 3 x LdD (cerca de 633 cópias/mL) e de 10 x LdD (cerca de 2110 cópias/mL).

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

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

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

Nas tabelas seguintes é apresentado um resumo dos resultados.

Repetibilidade intra-sessão ELITE InGenius								
Amostra	HSV1				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	-	-	-	24 / 24	23,59	0,41	1,72
3 x LoD	8 / 8	36,31	0,51	1,40				
10 x LoD	8 / 8	34,25	0,42	1,22				

Repetibilidade inter-sessão ELITE InGenius								
Amostra	HSV1				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 16	-	-	-	48 / 48	23,64	0,55	2,31
3 x LoD	16 / 16	36,15	0,52	1,44				
10 x LoD	16 / 16	34,24	0,42	1,21				

No teste de Repetibilidade no **ELITE InGenius**, o ensaio detetou o alvo HSV1 como esperado e mostrou valores de Ct com %CV abaixo de 5% para HSV1 e para o Controlo Interno.

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

Nas tabelas seguintes é apresentado um resumo dos resultados.

Repetibilidade intra-sessão ELITE BeGenius								
Amostra	HSV1				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	-	-	-	24 / 24	26,87	0,59	2,19
3 x LoD	8 / 8	37,82	0,65	1,73				
10 x LoD	8 / 8	35,82	0,47	1,32				

Repetibilidade inter-sessão ELITE BeGenius								
Amostra	HSV1				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 16	-	-	-	48 / 48	27,04	0,57	2,12
3 x LoD	16 / 16	37,53	0,64	1,71				
10 x LoD	16 / 16	35,55	0,53	1,50				

No teste da repetibilidade no **ELITE BeGenius®**, o ensaio detetou o alvo de HSV1 como esperado e mostrou valores de Ct com %CV abaixo de 5% para o HSV1 e para o controlo interno

**Reprodutibilidade**

A Reprodutibilidade dos resultados obtidos pelo produto HSV1 ELITe MGB Kit em associação com os sistemas **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** foi testada através da análise de um painel de amostras de sangue total. O painel incluiu uma amostra negativa e duas amostras reforçadas com material de referência certificado de HSV1 (fluido de cultura inativado por calor, vírus de herpes simples tipo 1 (HSV-1), ZeptoMetrix Corporation) a uma concentração de 3 x LdD (cerca de 633 cópias/mL) e de 10 x LdD (cerca de 2110 cópias/mL).

A Reprodutibilidade inter-instrumento no **ELITE InGenius** foi obtida através da análise de amostras do painel em oito réplicas, numa 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 "Extract + PCR" (Extração + PCR).

A Reprodutibilidade 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 "Extract + PCR" (Extração + PCR).

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

Na tabela seguinte é apresentado um resumo dos resultados.

Reprodutibilidade inter-instrumento ELITE InGenius								
Amostra	HSV1				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	-	-	-	24 / 24	23,55	0,57	2,40
3 x LoD	8 / 8	36,91	0,77	2,10				
10 x LoD	8 / 8	35,15	0,48	1,37				

Reprodutibilidade interlote ELITE InGenius								
Amostra	HSV1				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	-	-	-	24 / 24	23,09	0,63	2,73
3 x LoD	8 / 8	36,99	0,61	1,64				
10 x LoD	8 / 8	34,71	0,53	1,51				

No teste de Reprodutibilidade no **ELITE InGenius**, o ensaio detetou o alvo HSV1 como esperado e mostrou valores de Ct com %CV abaixo de 5% para HSV1 e para o Controlo Interno.

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

A Reprodutibilidade 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 "Extract + PCR" (Extração + PCR).

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

Na tabela seguinte é apresentado um resumo dos resultados.

Reprodutibilidade inter-instrumento ELITE BeGenius								
Amostra	HSV1				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	-	-	-	24 / 24	26,84	0,76	2,81
3 x LoD	8 / 8	37,26	0,59	1,58				
10 x LoD	8 / 8	36,12	0,79	2,18				

<b>HSV1 ELITe MGB® Kit</b>
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

Reprodutibilidade interlote ELITe BeGenius								
Amostra	HSV1				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	-	-	-	24 / 24	26,55	0,85	3,21
3 x LoD	8 / 8	37,96	1,08	2,83				
10 x LoD	8 / 8	36,40	0,69	1,91				

No teste da Reprodutibilidade no **ELITe BeGenius**, o ensaio detetou o alvo de HSV1 como esperado e mostrou valores de Ct com %CV abaixo de 5% para o HSV1 e para o controlo interno

#### Sensibilidade analítica: capacidade de reprodução com material de referência certificado

A sensibilidade analítica do ensaio, como a reprodutibilidade do valor de um material de referência calibrado, foi avaliada utilizando como material de referência o painel calibrado «HSV1 Molecular “Q” Panel» (Qnostics, Ltd, UK). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, deteção e interpretação do resultado, com o «**ELITe InGenius**» e produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o «ELITe InGenius»				
Amostra	Título nominal cópias/mL	Título nominal Registo <sub>10</sub> cópias/mL	Positivo/réplicas	Resultados médios Log <sub>10</sub> cópias / mL
HSV1MQP01-Alto	10 <sup>5</sup>	5,000	2/2	4,890
HSV1MQP01-Médio	10 <sup>4</sup>	4,000	2/2	3,859
HSV1MQP01-Baixo	10 <sup>3</sup>	3,000	2/2	2,736
HSV1MQP01-Negativo	negativo	-	0/2	-

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

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência o painel QCMD 2014 Herpes Simplex virus EQA Panel (Qnostics Ltd, Reino Unido), um painel de diluições de HSV1. 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 são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o «ELITe InGenius»				
Amostra	Consenso Log <sub>10</sub> conc. do vírus	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios Log <sub>10</sub> cópias / mL
HSVDNA14-01	HSV1, 3,657	0,563	2/2	3,716
HSVDNA14-02	Negativo, N.A.	N.A.	0/2	Não detetado
HSVDNA14-03	HSV1, 3,001	0,578	2/2	2,520
HSVDNA14-04	HSV1, 2,256	0,512	1/2	0,940
HSVDNA14-05	HSV1, 4,070	0,481	2/2	3,774
HSVDNA14-06	HSV2, 3,033	0,906	0/2	Não detetado
HSVDNA14-07	HSV2, 2,394	0,618	0/2	Não detetado
HSVDNA14-08	HSV2, 3,504	0,899	0/2	Não detetado
HSVDNA14-09	HSV1, 2,481	0,477	2/2	1,976
HSVDNA14-10	VZV, N.A.	N.A.	0/2	Não detetado

Todas as amostras negativas foram corretamente detetadas como negativas e todas as amostras positivas foram detetadas como positivas em conformidade com os resultados qualitativos definidos pelo consenso EQA. A amostra HSVDNA14-04 devolveu apenas um resultado positivo em 2 réplicas. Isto pode explicar-se pelo facto de o título de amostra estar abaixo do limite de deteção. Todas as amostras acima do limite de deteção do método foram quantificadas dentro do intervalo definido pelo Consenso Comercial de PCR em tempo real ± 2 desvios padrão.

<b>HSV1 ELITe MGB® Kit</b>
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

#### 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 positivas de sangue total colhido em EDTA, plasma colhido em EDTA e Líquido cefalorraquidiano em associação com o **ELITe InGenius**. Como o **ELITe BeGenius** mostrou desempenhos analíticos equivalentes para o **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**.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada usando 50 amostras de sangue total colhidas em EDTA negativas para ADN de HSV1, que foram reforçadas para ADN de HSV1 adicionando HSV12-04, uma amostra do painel QCMD 2012 Herpes Simplex Virus DNA EQA (Qnostics Ltd, UK) (N=30) e adicionando HSV1 ELITe-IQC High” (ELITech Group S.p.A.) (N=20) a um título de 750 cópias / mL, 30 amostras de plasma colhido em EDTA negativas para ADN de HSV1, que foram reforçadas para ADN de HSV1 adicionando “HSV1 ELITe-IQC High” (ELITech Group S.p.A.) a um título de 750 cópias / mL e 20 amostras de LCR negativas para ADN de HSV1, que foram reforçadas para ADN de HSV1 adicionando HSV1 ELITe-IQC High” (ELITech Group S.p.A.) a um título de 750 cópias / mL.

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.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA reforçado para ADN de HSV1	50	49	1
Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de HSV1	30	30	0
Líquido cefalorraquidiano reforçado para ADN de HSV1	20	20	0

49 de 50 amostras de sangue total foram confirmadas como sendo positivas. Uma amostra testou negativa. Tal pode ser explicado pela imprecisão do título do material calibrado usado para reforçar a amostra (HSV12-04 dp = 0. 517 Registo). Nas amostras reforçadas, tal poderá original uma carga viral abaixo do limite de deteção e as amostras podem testar estocasticamente negativas.

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio em associação com o sangue total neste teste foi igual a 98%.

Todas as amostras de plasma e líquido cefalorraquidiano foram válidas e positivas.

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio em associação com o plasma e o líquido cefalorraquidiano neste teste foi igual a 100%.

#### Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi avaliada através da análise de algumas amostras clínicas de sangue completo colhido em EDTA e plasma colhido em EDTA positivas e líquido cefalorraquidiano, negativas para ADN de HSV1 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**.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 34 amostras de sangue completo colhido em EDTA a partir de doadores saudáveis que estavam presumivelmente negativos para ADN de HSV1, 38 amostras de plasma colhido em EDTA a partir de doadores saudáveis que estavam presumivelmente negativos para ADN de HSV1 e 22 amostras de LCR de doadores saudáveis que eram presumivelmente negativos para ADN de HSV1.

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.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA e negativo para ADN de HSV1	34	0	34
Plasma colhido em EDTA negativo para ADN de HSV1	38	0	38
Líquido cefalorraquidiano negativo para ADN de HSV1	22	0	22

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

Todas as amostras de sangue total e líquido cefalorraquidiano foram válidas e negativas. A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 100%.

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

**AMOSTRAS E CONTROLOS****Amostras**

Este produto deve ser usado com **ADN extraído** das seguintes amostras clínicas: líquido cefalorraquidiano (LCR) e sangue total colhido em EDTA, plasma colhido em EDTA.

**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.

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 LCR com recurso ao «**EXTRAGEN**» kit, siga o manual de instruções de funcionamento: comece com **300 µL** da amostra, adicione **5 µL** de **CPE** para o controlo interno no início da extração. Dissolva o grânulo de ácidos nucleicos extraídos em **60 µL** de água ultrapura.

**Nota:** quando realizar a extração de ADN a partir de líquido cefalorraquidiano com o «**ELITE STAR**» e com a **versão de software 3.4.13** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **UUNI\_E100S200\_EL1**, 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 líquido cefalorraquidiano com o «**ELITE GALAXY**» com a **versão do software 1.3.1** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **xNA Extraction (Universal)**, que utiliza 300 µL de amostra e elui o extrato em 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 a partir de líquido cefalorraquidiano com o instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**», siga o protocolo de extração **Generic 2.0.1** e siga estas instruções: transfira **500 µL** da amostra para a tira de 8 furos e efetue a extração. Após os 10 minutos de incubação, adicione **5 µL** de **CPE** para o controlo interno antes de adicionar a **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** e prossiga com a extração. Elua os ácidos nucleicos em **100 µL** de tampão de eluição.

**Sangue total colhido em EDTA**

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

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

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

**Nota:** quando realizar a extração de ADN a partir de sangue total com o «**ELITE STAR**» e com **software versão 3.4.13** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **UUNI\_E100S200\_EL1**, que utiliza 200 µL de amostra e elui o extrato em 100 µL. As amostras nos tubos primários podem ser

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

carregadas diretamente no «**ELITE STAR**». É sempre necessário um volume mínimo de 700 µL para cada amostra. Adicione **200 µL** de **CPE** ao tubo Proteinase-Carrier como indicado no manual do kit de extração. Para o procedimento de extração, consulte o manual de instruções de utilização do kit de extração.

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

**Nota:** quando realizar a extração de ADN a partir de sangue total 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.

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

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

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 do plasma com o «**ELITE STAR**» e o **software versão 3.4.13** (ou versões superiores equivalentes), use o protocolo de extração **UUNI\_E100S200\_EL1**, 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 plasma com o «**ELITE GALAXY**» com **software versão 1.3.1** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **xNA Extraction (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 plasma com o instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**», siga o protocolo de extração **Generic 2.0.1** e siga estas instruções: transfira **500 µL** da amostra para a tira de 8 poços e efetue a extração. Após os 10 minutos de incubação, adicione **5 µL** de **CPE** para o controlo interno antes de adicionar a **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** e prossiga com a extração. Elua os ácidos nucleicos em **100 µL** de tampão de eluição.

**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 “controlo 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.

**Outras amostras:**

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

**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.

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

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 «**HSV1 - ELITe Positive Control**» ou o produto «**HSV1 ELITe Standard**».

**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 HSV1 com o "dispositivo de relatório" = "FAM" e o "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) " e dar-lhe o nome "HSV1";

- definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda de Internal Control com o "dispositivo de relatório" = "VIC" (AP525 é semelhante ao VIC) e o "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) " e dar-lhe o nome "CI";

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

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

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 (aquisição de fluorescência)	30 seg.
	72 °C	20 seg.
Dissociação (opcional)	95 °C	15 seg.
	40 °C	30 seg.
	80 °C	15 seg.

Quando é usado um **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 HSV1 com o "dispositivo de relatório" = "FAM" e o "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) " e dar-lhe o nome "HSV1";

- 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 algumas amostras é mostrada, a título de exemplo, no parágrafo anterior a descrever o procedimento para o instrumento **Sistema de PCR em tempo real 7300**.

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

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

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

- modifique o tempo como indicado na tabela "**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**;

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;
- descongele os tubos da **HSV1 Q - PCR Mix** 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 **HSV1 - ELITe Positive Control** ou do **HSV1 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 **HSV1 Q - PCR Mix** no fundo dos poços da **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Evite a criação de bolhas.

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

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

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

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

- Quando for necessário um resultado **qualitativo** (deteção de ADN de HSV1): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **HSV1 - Positive Control** no poço correspondente na **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o controlo positivo introduzindo com a pipeta o **HSV1 - ELITe Positive Control** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.

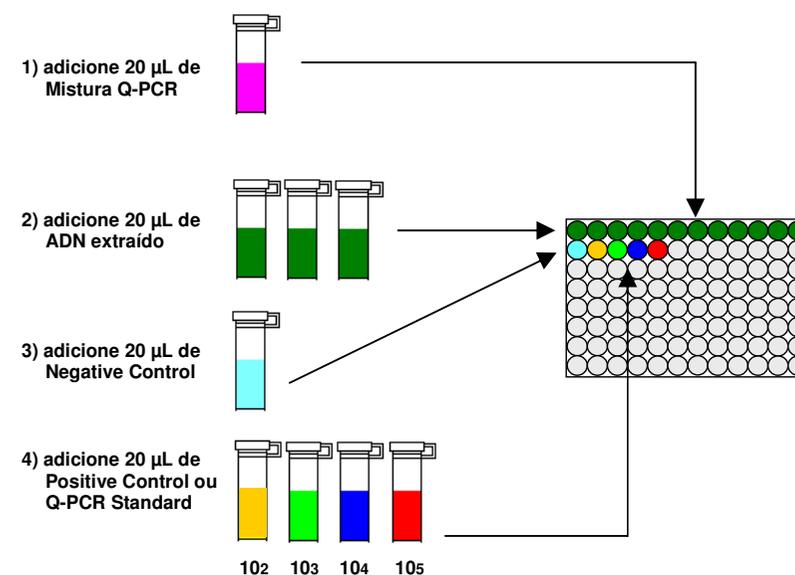
- Quando for necessário um resultado **quantitativo** (quantificação de ADN de HSV1): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **HSV1 Q - PCR Standard 102**

no poço correspondente na **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o padrão introduzindo com a pipeta o **HSV1 Q - PCR Standard 102** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma com os outros **HSV1 Q - PCR Standards (103, 104, 105)**.

- Vede com precisão a **microplaca da amplificação** com recurso à **folha vedante da amplificação**.
- Transfira a **microplaca da amplificação** para o ciclo térmico em tempo real na área de amplificação/deteção de produtos de amplificação e inicie o ciclo térmico para a amplificação guardando a definição da sessão com um nome de ficheiro inequívoco e reconhecível (por ex., "ano-mês-dia-HSV1-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 reação completa e a microplaca de amplificação tal como indicado no manual do utilizador do instrumento e seguindo os passos exigidos pela GUI.

<b>HSV1 ELITe MGB® Kit</b> reagente para amplificação em tempo real do ADN
---

**REF** RTS031PLD

#### Análise qualitativa dos resultados

Os valores registados da fluorescência emitida pela sonda específica do HSV1 (detetor FAM "HSV1") 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 HSV1, a fluorescência FAM da sonda específica do HSV1 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 "HSV1" 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 "HSV1" 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 **Positive Control\***, o valor de **Ct** do HSV1 (Resultados > Relatório) é usado para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Detetor de reação de controlo positivo FAM "HSV1"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
<b>Ct ≤ 25</b>	<b>POSITIVO</b>	<b>CORRETO</b>

Se o resultado da reação de amplificação **Positive Control** para a **Ct > 25** ou **Ct indeterminada** para HSV1, o ADN do 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 HSV1, foram preparadas as reações de **Q - PCR Standard** em vez da reação de **Positive Control**. 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 do **Negative Control**, o valor da **Ct** do HSV1 (Resultados > Relatório) é usado para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Negative Control reaction detector FAM "HSV1"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
<b>Ct não determinado</b>	<b>NEGATIVO</b>	<b>CORRETO</b>

Se o resultado da reação de amplificação **Controlo negativo** for diferente de **Ct não determinado** para HSV1, o ADN alvo não foi detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação (contaminação), que podem originar resultados incorretos e falsos positivos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

Na reação de amplificação de cada **amostra**, o valor de **Ct** do HSV1 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).

<b>HSV1 ELITe MGB® Kit</b> reagente para amplificação em tempo real do ADN
---

**REF** RTS031PLD

Este produto é capaz de detetar uma quantidade mínima de cerca de 10 cópias de ADN do gene gpD de HSV1 na reação de amplificação, que corresponde a 10 equivalentes genómicos por reação (limite de deteção, consulte o parágrafo Características de desempenho).

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

Reação da amostra		Adequação da amostra	Resultado do ensaio	HSV1 DNA
detetor FAM "HSV1"	detetor VIC "CI"			
<b>Ct não determinado</b>	<b>Ct &gt; 35 ou Ct não determinado</b>	<b>inadequado</b>	<b>inválido</b>	-
	<b>Ct ≤ 35</b>	<b>adequado</b>	<b>válido, negativo</b>	<b>NÃO DETETADO</b>
<b>Ct determinado</b>	<b>Ct &gt; 35 ou Ct não determinado</b>	<b>adequado*</b>	<b>válido, positivo</b>	<b>DETETADO</b>
	<b>Ct ≤ 35</b>	<b>adequado</b>	<b>válido, positivo</b>	<b>DETETADO</b>

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct não determinado** para o HSV1 e **Ct > 35** ou **Ct não determinado** para o Controlo interno, significa que é 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 (perda de ADN durante a extração ou presença de inibidores) 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 indeterminada** para o HSV1 e **Ct ≤ 35** para o controlo interno, significa que o ADN do HSV1 não é detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode excluir-se o facto de o ADN do HSV1 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 HSV1 é detetado na reação de amplificação de uma amostra, o Internal Control pode resultar em **Ct > 35** ou **Ct não determinado**. Na realidade, a reação de amplificação de baixa eficiência para o Internal Control pode ser deslocada por concorrência com a reação de amplificação de elevada eficiência para o ADN do HSV1. 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 HSV1 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:

Standard Curve detector FAM "HSV1"	Intervalo de aceitação	Amplificação/deteção
<b>Coefficiente de correlação (R2)</b>	<b>0,990 ≤ R2 ≤ 1,000</b>	<b>CORRETO</b>

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 HSV1 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 gpG de HSV1 na reação de amplificação, que corresponde a Equivalentes genômicos por reação (intervalo de medição linear, consulte o parágrafo Características de desempenho), tal como descrito na tabela seguinte:

Sample result detector FAM "HSV1"	Equivalentes do genoma HSV1 por reação
Quantidade > 1 x 10 <sup>6</sup>	MAIS DE 1.000.000
1 x 10 <sup>1</sup> ≤ Quantidade ≤ 1 x 10 <sup>6</sup>	= Quantidade
Quantidade < 1 x 10 <sup>1</sup>	MENOS DE 10

Os resultados (**Quantidade**) de cada **amostra** (Resultados > Relatório) são usados para calcular os equivalentes genômicos (**gEq**) do HSV1 presente na amostra usada na extração (**Nc**) de acordo com esta fórmula:

$$Nc \text{ (gEq)} = \frac{Ve \times \text{Quantidade}}{Vc \times Va \times Ep}$$

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 «**EXTRAgen**» com amostras de líquido cefalorraquidiano e é necessário o resultado **expresso em gEq/mL**, a fórmula passa a ser:

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = 12,5 \times \text{Quantidade}$$

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Cálculo dos limites do intervalo de medição linear**

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

$$\text{Limite inferior (gEq/mL)} = \frac{Ve \times 10 \text{ gEq}}{Vc \times Va \times Ep}$$

$$\text{Limite superior (gEq/mL)} = \frac{Ve \times 1.000.000 \text{ gEq}}{Vc \times Va \times Ep}$$

Quando é usado o kit de extração «**EXTRAgen**» com amostras de líquido cefalorraquidiano, a fórmula passa a ser:

$$\begin{aligned} \text{Limites do intervalo de medição linear (gEq/mL) «EXTRAgen»} \\ \text{Limite inferior (gEq/mL)} &= 12,5 \times 10 \text{ gEq} \\ \text{Limite superior (gEq/mL)} &= 12,5 \times 1.000.000 \text{ gEq} \\ &\text{de 125 a 12.500.000 gEq/mL} \end{aligned}$$

Quando é usado o kit de extração «**EXTRAblood**» com amostras de sangue total colhido em EDTA, 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 «**ELITe STAR**» com amostras de sangue total, plasma colhido em EDTA ou amostras de líquido cefalorraquidiano, 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 de sangue total, plasma colhido em EDTA ou amostras de líquido cefalorraquidiano, a fórmula passa a ser:

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

<b>HSV1 ELITe MGB® Kit</b>
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

Quando é usado o kit de extração «NucliSENS® easyMAG®» com amostras de plasma colhido em EDTA ou amostras de líquido cefalorraquidiano, a fórmula passa a ser:

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

Quando é usado o kit de extração «QIASymphony® SP/AS» com amostras de plasma colhido em EDTA, 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 12.000.000 gEq/mL	

### CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

#### Sensibilidade analítica: limite de deteção

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

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

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

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

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de sangue total e o «ELITE GALAXY» foi verificada com um painel de diluições de HSV1 dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da amostra HSV08-01 do "QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel (Qnostics, Ltd, RU)" em ADN de HSV1 - sangue total EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 10 gEq/mL a 560 gEq/mL. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração e Configuração PCR com o «ELITE GALAXY» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

A sensibilidade analítica como gEq/mL está reportada a seguir

Limite de deteção para amostras de sangue total e «ELITE GALAXY» (gEq/mL)			
intervalo de 95% de confiança			
		limite inferior	limite superior
<b>95% de positividade</b>	<b>211 gEq/mL</b>	135 gEq/mL	498 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 HSV1 dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da amostra HSV08-01 do "QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel" (Qnostics, Ltd, RU) em ADN de HSV1 - plasma EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 10 gEq/mL a 560 gEq/mL. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração e Configuração PCR com o «ELITE GALAXY» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

<b>HSV1 ELITe MGB® Kit</b>
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

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
<b>95% de positividade</b>	<b>95 gEq/mL</b>	55 gEq/mL	554 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 registo10 entre uma diluição e a seguinte) de ADN de plasmídeo contendo o produto de amplificação, cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. As diluições de 107 moléculas por reação a 101 moléculas por reação foram testadas em 9 réplicas através da realização da amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

A análise dos dados obtidos, realizada por regressão linear, demonstrou que o ensaio mostra uma resposta linear para 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 por reação, o que corresponde ao equivalente de genoma por reação, dentro de um algoritmo desde a concentração mais alta do standard de amplificação Q - PCR Standard (105 moléculas/20 µL).

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

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte:

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

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

#### Sensibilidade analítica: Precisão e exatidão

A precisão do ensaio, enquanto variabilidade dos resultados obtidos com várias réplicas de uma amostra testada dentro da mesma sessão, permitiu obter uma percentagem média do Coeficiente de variação (% CV) de cerca de 22,7% 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 10,1% 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 testando um painel de proficiência.

<b>HSV1 ELITe MGB® Kit</b>
reagente para amplificação em tempo real do ADN

**REF** RTS031PLD

Foram realizados testes utilizando como material de referência calibrado um painel de diluições de HSV1 dentro do limite de concentração (QCMD 2007 Herpes Simplex Virus EQA Panel, Qnostics Ltd, RU). Cada amostra foi usada em duplicado para realizar toda a análise, extração com «EXTRAgen» e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o «EXTRAgen»				
Amostra	Consenso do ensaio comercial Log <sub>10</sub> Conc. do vírus	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios Log <sub>10</sub> gEq / mL
HSV07-01	HSV2, 4,243	0,730	0 / 2	Não detetado
HSV07-02	HSV1, 4,282	0,363	2 / 2	4,292
HSV07-03	Negativo, NA	N/A	0 / 2	Não detetado
HSV07-04	HSV1, 2,593	0,536	2 / 2	3,040
HSV07-05	HSV2, 2,695	1,301	0 / 2	Não detetado
HSV07-06	Negativo, NA	N/A	0 / 2	Não detetado
HSV07-07	HSV1, 7,292	0,387	2 / 2	7,396
HSV07-08	HSV1, 4,204	0,339	2 / 2	4,336
HSV07-09	HSV2, 1,890	0,313	0 / 2	Não detetado
HSV07-10	HSV1, 5,275	0,292	2 / 2	5,351
HSV07-11	HSV2, 6,134	0,897	0 / 2	Não detetado
HSV07-12	VZV, NA	N/A	0 / 2	Não detetado

Todas as amostras foram detetadas corretamente. Os resultados quantitativos estão dentro do intervalo definido pelo Desvio padrão  $\pm 1$  do consenso.

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência calibrado um painel de diluições de HSV1 dentro do limite de concentração (QCMD 2012 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, RU). 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 são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o «ELITE STAR»				
Amostra	Consenso do ensaio comercial Log <sub>10</sub> Conc. do vírus	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios Log <sub>10</sub> gEq / mL
HSV12-01	Negativo, NA	-	0 / 2	-
HSV12-02	HSV1, 3,910	0,582	2 / 2	4,047
HSV12-03	HSV2, 1,948	0,305	0 / 2	-
HSV12-04	HSV1, 3,680	0,547	2 / 2	4,070
HSV12-05	HSV2, 1,352	0,629	0 / 2	-
HSV12-06	HSV1, 2,318	0,441	2 / 2	2,353
HSV12-07	HSV1, 2,014	0,296	0 / 2	-
HSV12-08	HSV2, 3,424	1,098	0 / 2	-
HSV12-09	Negativo, NA	-	0 / 2	-
HSV12-10	HSV2, 3,417	1,042	0 / 2	-

Todas as amostras negativas foram relatadas corretamente. As amostras positivas dentro do LdD teórico do sistema (280 cópias/mL) foram corretamente detetadas dentro do intervalo do valor de "Consenso" médio do ensaio comercial  $\pm 1$  de desvio padrão. Uma amostra abaixo do limite de detecção teórico do sistema (103 cópias/mL) foi relatada como negativa. As amostras com título abaixo do limite de detecção podem ser estocasticamente relatadas como positivas ou negativas.

Foram realizados testes adicionais utilizando como material de referência calibrado um painel de diluições de HSV1 dentro do limite de concentração (QCMD 2012 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, RU). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração com «ELITE GALAXY» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

<b>HSV1 ELITe MGB® Kit</b>
reagente para amplificação em tempo real do ADN

**REF** RTS031PLD

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o «ELITE GALAXY»				
Amostra	Consenso do ensaio comercial Log <sub>10</sub> Conc. do vírus	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios Log <sub>10</sub> gEq / mL
HSV12-01	Negativo, NA	-	0/2	-
HSV12-02	HSV1, 3,910	0,582	2/2	3,895
HSV12-03	HSV2, 1,948	0,305	0/2	-
HSV12-04	HSV1, 3,680	0,547	2/2	3,867
HSV12-05	HSV2, 1,352	0,629	0/2	-
HSV12-06	HSV1, 2,318	0,441	2/2	2,215
HSV12-07	HSV1, 2,014	0,296	1/2	1,962
HSV12-08	HSV2, 3,424	1,098	0/2	-
HSV12-09	Negativo, NA	-	0/2	-
HSV12-10	HSV2, 3,417	1,042	0/2	-

Todas as amostras negativas foram relatadas corretamente. As amostras positivas foram corretamente detetadas dentro do intervalo do valor de "Consenso" médio do ensaio comercial  $\pm 1$  de desvio padrão. Uma de duas réplicas da amostra HSV12-07 não foi detetada. O resultado discrepante pode ser explicado pelo título da amostra (103,28 gEq/mL) estar em torno do limite de detecção do método. A amostra foi no entanto indicada como sendo positiva.

#### Sensibilidade de diagnóstico: eficiência de detecção e quantificação em diferentes genótipos/subtipos

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

A análise das regiões escolhidas para a hibridização dos primers e da sonda fluorescente no alinhamento das sequências disponíveis na base de dados para o gene gpD do HSV1 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 total colhidos em EDTA, com teste positivo para ADN de HSV1.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 21 amostras de líquido cefalorraquidiano negativas, reforçadas para um título mais baixo de ADN de HSV1 adicionando amostras HSV07-02, HSV07-08, HSV07-10 de QCMD 2007 Herpes simplex virus Proficiency Panel (Qnostics Ltd, UK) e 20 amostras de sangue total colhidas em EDTA de doadores saudáveis presumivelmente negativos para ADN de HSV1 (Biological Sample Library Europe S.A.S., Lyon, France), reforçadas para um título mais baixo de ADN de HSV1 adicionando amostra HSV08-03 do painel QCMD 2008 Herpes simplex virus EQA Panel (Qnostics Ltd, UK). Cada amostra de líquido cefalorraquidiano foi usada para realizar toda a análise, extração com «EXTRAgen» e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A. Cada amostra de sangue total foi usada para realizar toda a análise, extração com «EXTRAblood» e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Líquido cefalorraquidiano reforçado para ADN de HSV1	21	21	0
Sangue total colhido em EDTA reforçado para ADN de HSV1	20	20	0

Todas as amostras reforçadas foram corretamente detetadas como positivas para ADN de HSV1. A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 100%.

<b>HSV1 ELITe MGB® Kit</b>
reagente para amplificação em tempo real do ADN

**REF** RTS031PLD

A sensibilidade do diagnóstico foi avaliada usando 22 amostras de líquido cefalorraquidiano negativo para ADN de HSV1, que foram reforçadas para ADN de HSV1 usando amostra HSV08-07, do painel QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel (Qnostics Ltd, UK), 30 amostras de plasma negativas para ADN de HSV1, que foram reforçadas para ADN de HSV1 adicionando amostra HSV08-03, do painel QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel (Qnostics Ltd, UK) e 30 amostras de sangue total negativas para ADN de HSV1, que foram reforçadas para ADN de HSV1 adicionando HSV08-03, do painel QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel (Qnostics Ltd, UK). Cada amostra foi usada para realização de todo o procedimento de análise: extração com «**ELITE STAR**» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Líquido cefalorraquidiano reforçado para ADN de HSV1	22	22	0
Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de HSV1	30	30	0
Sangue total colhido em EDTA reforçado para ADN de HSV1	30	27	1

Dois amostras positivas para HSV1 deram um resultado inválido.

Uma amostra deu resultado negativo. A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 98,7%.

A sensibilidade diagnóstica foi avaliada usando 20 amostras de líquido cefalorraquidiano negativas para ADN de HSV1, que foram reforçadas para ADN de HSV1 adicionando amostra de HSV08-07, do QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel (Qnostics Ltd, UK), 30 amostras de plasma negativo para ADN de HSV1, que foram reforçadas para ADN de HSV1 adicionando amostra HSV08-07, do painel QCMD 2008 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel, (Qnostics Ltd, UK) e 30 amostras de sangue total negativas para ADN de HSV1, que foram reforçadas para ADN de HSV1 adicionando amostra de HSV08-07, do painel QCMD 2008 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel, (Qnostics Ltd, UK) e amostra de HSV10-07, do painel QCMD 2010 Herpes Simplex Human virus DNA EQA Panel, (Qnostics Ltd, UK). Cada amostra foi usada para realização de todo o procedimento de análise: extração com «**ELITE GALAXY**» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Líquido cefalorraquidiano reforçado para ADN de HSV1	20	20	0
Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de HSV1	30	30	0
Sangue total colhido em EDTA reforçado para ADN de HSV1	30	30	0

Todas as amostras reforçadas foram corretamente detetadas como positivas para ADN de HSV1.

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

#### Especificidade analítica: ausência de marcadores potencialmente interferentes de reatividade cruzada

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

A análise do alinhamento das sequências dos primários e da sonda fluorescente com as sequências disponíveis nas bases de dados para organismos diferentes do HSV1, incluindo genomas completos de HSV2 e VZV, o vírus herpético humano que é o mais semelhante ao HSV1, 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 através de testes num painel de proficiência.

A especificidade analítica foi avaliada utilizando como material de referência calibrado e certificado um painel que inclui amostras positivas de HSV2 e positivas de VZV (QCMD 2007 Herpes simplex virus EQA Panel, Qnostics Ltd, RU). Cada amostra foi testada em duplicado através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

<b>HSV1 ELITe MGB® Kit</b>
reagente para amplificação em tempo real do ADN

**REF** RTS031PLD

Os resultados são comunicados no parágrafo "Sensibilidade analítica: capacidade de reprodução com material de referência calibrado".

Não foi detetada qualquer reatividade cruzada com amostras positivas para HSV2 e VZV.

#### 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 ADN de HSV1 e líquido cefalorraquidiano e sangue total colhidos em EDTA, com testes negativos para ADN de HSV1.

A especificidade do diagnóstico foi avaliada usando como material de referência 28 amostras de líquido cefalorraquidiano que estavam negativas para ADN de HSV1 (testadas com produto de amplificação em tempo real IVD CE), e 24 amostras de sangue total colhidas em EDTA de doadores presumivelmente negativos para ADN de HSV1 (Biological Sample Library Europe S.A.S., Lyon, France). Cada amostra de líquido cefalorraquidiano foi usada para realizar toda a análise, extração com «**EXTRAGEN**» e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A. Cada amostra de sangue total foi usada para realizar toda a análise, extração com «**EXTRABLOOD**» e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Líquido cefalorraquidiano negativo para ADN de HSV1	28	0	27
Sangue total colhido em EDTA e negativo para ADN de HSV1	24	1	23

Uma amostra de líquido cefalorraquidiano apresentou um resultado inválido, possivelmente pela presença de um inibidor.

Uma amostra de sangue total apresentou um resultado discordante com um título viral muito baixo (inferior a 1 gEq/reação). Esta amostra, com resultado negativo mais válido numa sessão de amplificação independente, é mais baixa que o limite de deteção do produto que fornece aleatoriamente resultados negativos ou positivos em diferentes sessões.

O resultado discordante podem ser explicado tendo em consideração que a amostra de sangue total é apenas presumivelmente negativa para ADN de HSV1, um vírus amplamente disseminado na população de uma forma latente. A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 98,0%.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 24 amostras de líquido cefalorraquidiano negativas para ADN de HSV1, 30 amostras de plasma colhido em EDTA negativas para ADN de HSV1 e 30 amostras de sangue total colhido em EDTA negativas para ADN de HSV1 (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi usada para realização de todo o procedimento de análise: extração com «**ELITE STAR**» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Líquido cefalorraquidiano negativo para ADN de HSV1	24	0	24
Plasma colhido em EDTA negativo para ADN de HSV1	30	0	30
Sangue total colhido em EDTA e negativo para ADN de HSV1	30	1	28

Uma amostra negativa para HSV1 apresentou um resultado inválido.

Uma amostra apresentou um resultado positivo com um título viral igual a 65 gEq/mL. Devido ao baixo título viral, não foi possível detetar as amostras durante a análise com o método de referência. A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 98,8 %

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 22 amostras de líquido cefalorraquidiano negativas para ADN de HSV1, 34 amostras de plasma colhido em EDTA presumivelmente negativas para ADN de HSV1 e 36 amostras de sangue total colhido em EDTA presumivelmente negativas para ADN de HSV1. Cada amostra foi usada para a realização de todo o procedimento de análise: extração com «**ELITE GALAXY**» e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

<b>HSV1 ELITe MGB® Kit</b> reagente para amplificação em tempo real do ADN
---

**REF** RTS031PLD

Amostras	N	positivo	negativo
Líquido cefalorraquidiano negativo para ADN de HSV1	22	0	22
Plasma colhido em EDTA negativo para ADN de HSV1	34	0	34
Sangue total colhido em EDTA e negativo para ADN de HSV1	36	0	36

Todas as amostras foram corretamente detetadas como negativas para ADN de HSV1. A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 100%.

**Roche cobas z 480 analyzer**

**AMOSTRAS E CONTROLOS**

#### Amostras

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

#### Sangue total colhido em EDTA

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

**Nota:** quando realizar a extração de ADN de amostras de sangue total 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.

#### Outras amostras:

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

<b>HSV1 ELITe MGB® Kit</b> reagente para amplificação em tempo real do ADN
---

**REF** RTS031PLD

#### 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 positivo control, utilize o produto «**HSV1 - ELITe Positive Control**» ou, em alternativa, o produto «**HSV1 - ELITe Positive Control RF**» ou o produto «**HSV1 ELITe Standard**».

#### Controlo da qualidade

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

## PROCEDIMENTO

#### Definição da sessão de amplificação em tempo real

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

Quando for utilizado o instrumento **analisador cobas z 480 (Roche)**:

- Antes de iniciar a sessão, e através da consulta da documentação do instrumento, é necessário:
- ligar o computador de controlo e o ciclo térmico em tempo real. Abra o software dedicado e, na janela principal, abra uma sessão "Nova experiência";
  - defina o volume de reação ("Volume de reação") para 40 µL;
  - atribua um identificador a cada amostra ("Editor da amostra");
  - defina o Ciclo térmico da reação de acordo com a seguinte tabela:

Ciclo térmico		
Fase	Temperaturas	Períodos
Descontaminação	50°C	2 mins.
Desnaturação inicial	94°C	2 mins.
Amplificação e deteção (45 ciclos)	94°C	10 seg.
	60 °C (aquisição de fluorescência)	30 seg.
	72°C	20 seg.

**Nota:** a aquisição de fluorescência ocorre individualmente, defina a Taxa Ramp (°C/seg.) para 4,4 °C/seg.

- seleccione os canais de deteção do sinal: "detetor" para o sensor de HSV1 com "FAM 465-510 de canal" e "detetor" para o sensor de controlo interno CI com "VIC 540-580 de canal"

Preencha o **Plano de trabalho** anexo no final deste Manual do utilizador, transcrevendo esta informação ou imprimindo a disposição da microplaca. O **Plano de trabalho** deve ser atentamente seguido acaando da transferência da mistura de reação e das amostras para os furos.

**Nota:** para determinar a concentração de ADN na amostra inicial, deverá realizar uma série de reações com o **Q - PCR Standard** (10<sup>5</sup> cópias, 10<sup>4</sup> cópias, 10<sup>3</sup> cópias, 10<sup>2</sup> cópias) para obter a **Curva standard**.



**HSV1 ELITe MGB® Kit**

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

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

Os valores **Ct** para HSV1 nas reações de amplificação dos quatro **Q - PCR Standard** são usados para calcular a **Curva Standard** (Resultados > Curva Standard) dessa sessão de amplificação e para validar a amplificação e a deteção como mostrado na tabela seguinte:

Reaction Q - PCR Standard 10 <sup>5</sup> "HSV1" detector	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação **Positive Control** para a **Ct > 25** ou **Ct indeterminada** para HSV1, o ADN do 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 HSV1, foram preparadas as reações de **Q - PCR Standard** em vez da reação de **Positive Control**. Neste caso, valide a amplificação e a deteção através da referência à reação de amplificação de **Q - PCR Standard 10<sup>5</sup> (Ct ≤ 25)**.

Durante a reação de amplificação do **Negative Control**, o valor de **Ct** do HSV1 (Janela de análise) é usado para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Negative Control Reaction "HSV1" detector	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct não determinado	NEGATIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação do **Negative Control** for diferente de **Ct indeterminada** para HSV1, foi detetada a presença do ADN do 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 HSV1 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	HSV1 DNA
Detetor "HSV1"	Detetor "IC"			
Ct não determinado	Ct > 35 ou Ct não determinado	não adequado	inválido	-
	Ct ≤ 35	adequado	válido, negativo	NÃO DETETADO
Ct determinado	Ct > 35 ou Ct não determinado	adequado	válido, positivo	DETETADO
	Ct ≤ 35	adequado	válido, positivo	DETETADO

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct não determinado** para HSV1 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,

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

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 HSV1 e **Ct ≤ 35** para o Controlo Interno, o ADN do HSV1 não foi detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode excluir-se o facto de o ADN do HSV1 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 HSV1 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 HSV1 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 10<sup>5</sup>** 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 HSV1 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 utilizando o sistema de extração **MagNA Pure 24** (ver Características de desempenho), como mostrados na tabela seguinte:

Sample result FAM "HSV1" detector	Cópias HSV1 por reação
Quantidade > 1 x 10 <sup>6</sup>	MAIS DE 1.000.000
1,0 x 10 <sup>1</sup> ≤ Quantidade ≤ 1 x 10 <sup>6</sup>	= Quantidade
Quantidade < 1,0 x 10 <sup>1</sup>	MENOS DE 10

Os resultados (**Quantidade**) relacionados com cada **amostra** (Janela de análise) são usados para calcular as **cópias** de HSV1 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**.

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

**Fórmula simplificada para sangue total e MagNA Pure 24**

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

**CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO****Sensibilidade analítica: limite de detecção**

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

A sensibilidade analítica deste ensaio, como limite de detecção, foi testado usando um ADN de plasmídeo que contém o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida usando um espectrofotômetro. O ADN de plasmídeo foi diluído para uma concentração de 10 cópias/20 µL em 150.000 cópias de pBETAGLOBIN/20 µL. Esta amostra foi utilizada em 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 Beta-globina	18	18	0

**Sensibilidade analítica: intervalo de medição linear**

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

A sensibilidade analítica deste ensaio foi avaliada com recurso a um painel de diluições (1 registo<sup>10</sup> entre uma diluição e a seguinte) de ADN de plasmídeo contendo o produto de amplificação, cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotômetro. Os pontos do painel de 10<sup>7</sup> moléculas por reação a 10<sup>1</sup> moléculas por reação foram testadas em 9 réplicas para realização da amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise dos dados obtidos, realizada com regressão linear, mostrou que o ensaio tem uma resposta linear para todos os pontos do painel (coeficiente de correlação linear superior a 0,99).

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

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

Os resultados estão mostrados na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear utilizando o MagNA Pure 24		
	Limite inferior	Limite superior
cópias/mL	25	25.000.000
cópias/reação	10	10.000.000

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

**Sensibilidade analítica: Precisão e exatidão**

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

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

A precisão deste ensaio, em termos de diferença entre a média dos resultados obtidos na mesma sessão de amplificação utilizando diferentes réplicas de uma amostra e o valor de concentração teórica da amostra, permitiu obter uma percentagem média de Imprecisão da quantidade de Registo medida de cerca de 3% dentro do intervalo de 10<sup>6</sup> moléculas a 10<sup>1</sup> moléculas em 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

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

**Sensibilidade analítica: capacidade de reprodução com material de referência certificado**

A sensibilidade analítica do ensaio, como a capacidade de reprodução do valor de um material de referência calibrado, foi avaliada utilizando como material de referência o «Painel "Q" molecular de HSV1 (Qnostics Ltd, RU). Cada amostra do painel foi testada em 4 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise: extração com o sistema de extração automática **MAGNA Pure 24** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o «MagNA Pure 24»	
Amostra	Positivos/réplicas
HSV1MQP01-Alto	2/2
HSV1MQP01-Médio	2/2
HSV1MQP01-Baixo	2/2
HSV1MQP01-Negativo	0/2

Todas as amostras foram detetadas corretamente.

**Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas**

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 30 amostras de sangue total colhido em EDTA negativas para ADN de HSV1, que foram reforçadas para ADN de HSV1 adicionando HSV1MQP01-High sample (Qnostics Ltd, RU), e 29 amostras de plasma colhidas em EDTA, negativas para ADN de HSV1, que foram reforçadas com ADN de HSV1 adicionando HSV1MQP01-High sample (Qnostics Ltd, RU).

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

Amostras	N	positivos	negativos
Sangue total colhido em EDTA reforçado para ADN de HSV1	30	30	0
Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de HSV1	29	29	0

Todas as amostras foram válidas no primeiro teste e confirmadas positivas para ADN de HSV1.

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

**Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas**

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 40 amostras de sangue total colhido em EDTA presumivelmente negativas para ADN de HSV1 e 34 amostras de plasma colhido em EDTA presumivelmente negativas para ADN de HSV1.

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

Amostras	N	positivos	negativos
Sangue total colhido em EDTA presumivelmente negativo para ADN de HSV1	40	1	39
Plasma colhido em EDTA e presumivelmente negativo para ADN de HSV1	34	0	34

Todas as amostras de sangue total foram válidas no primeiro teste e trinta e nove (39) de quarenta (40) amostras de sangue total foram confirmadas negativas para ADN de HSV1, enquanto uma amostra mostrou um resultado discrepante positivo.

A especificidade de diagnóstico do ensaio associada às amostras de sangue total foi de 98%.

Todas as amostras de plasma foram válidas no primeiro teste e confirmadas negativas para ADN de HSV1.

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

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

**Robustez: resultados inválidos utilizando amostras clínicas**

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

O número de amostras inválidas foi verificado utilizando os resultados de amostras clínicas que foram negativas e positivas para ADN de HSV1 e analisadas com o sistema de extração automática **MagNA Pure 24** e através da amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.. Os resultados estão mostrados na tabela seguinte.

Amostras	N	Inválido	%
Sangue total colhido em EDTA	70	0	0
Plasma colhido em EDTA	63	0	0

**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 "HSV1 ELITe MGB® Kit", FTP RTS031PLD.

**REFERÊNCIAS**

E. Aurelius et al. (1993) *J. Med. Virology* **39**: 179 - 186  
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**: e30

**LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO**

Utilize este produto apenas com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: líquido cefalorraquidiano (LCR), sangue total colhido em EDTA, plasma colhido em EDTA.

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

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

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

Utilize plataformas diferentes apenas com as amostras clínicas indicadas na secção "Amostras e Controlos".

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

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

Devido à sua elevada sensibilidade analítica, o método de amplificação em Tempo real usado neste produto é sensível a contaminações cruzadas a partir de amostras clínicas positivas do HSV1, 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 escrupuloso 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.

**HSV1 ELITe MGB® Kit**

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS031PLD

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 HSV1 não foi detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode negligenciar-se o facto de o ADN de HSV1 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 HSV1.

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

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, existe um risco residual de resultados inválidos, falsos positivos e falsos negativos obtidos com este produto. Este risco residual não pode ser eliminado ou ainda mais reduzido. Em alguns casos, como o diagnóstico pré-natal ou 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 Positive Control ou Q - PCR Standard ou coeficiente de correlação inválido da Curva standard	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	Tenha cuidado quando distribuir reagentes para os furos da microplaca e cumpra a ficha de trabalho. Verifique os volumes da mistura de reação distribuída. Verifique os volumes do controlo positivo ou standard distribuído.
Preparação da sessão incorreta no ELITe InGenius® e no ELITE BeGenius®	Verifique a posição da mistura de reação, do controlo positivo ou dos standards. Verifique os volumes da mistura de reação, do controlo positivo ou dos standards.
Degradação da sonda.	Use uma nova alíquota da mistura de reação.
Degradação do controlo positivo ou standard.	Utilize uma nova alíquota de controlo positivo ou standard.
Erro na configuração do instrumento.	Verifique as definições de posição para as reações de controlo positivo ou standard no instrumento. Verifique as definições do ciclo térmico no instrumento.

ADN alvo detetado na reação de Negative Control	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta para os furos da microplaca.	Evite derramar o conteúdo do tubo de teste da amostra. Mude sempre as pontas entre uma amostra e a outra. Tenha cuidado quando distribuir amostras, controlos negativos, controlos positivos 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 das reações de amplificação.	Limpe as superfícies e instrumentos com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos de ensaio e as pontas em utilização.

**ADN alvo e de Internal Control não detetado nas reações da amostra**

<b>Causas possíveis</b>	<b>Soluções</b>
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" (Apenas PCR). Repita a extração e amplificação da amostra.
Armazenamento incorreto do reagente.	Verifique se a mistura de reação não foi exposta a uma temperatura ambiente durante mais de 30 minutos.
Problemas durante a extração	Verifique a qualidade e a concentração do ADN extraído.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

**Fluorescência de fundo irregular ou elevada nas reações**

<b>Causas possíveis</b>	<b>Soluções</b>
Distribuição incorreta da amostra.	Tenha cuidado, inserindo a pipeta três vezes, quando misturar amostras, controlos negativos, controlos positivos ou standards na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.
Erro na configuração da linha de base.	Defina o intervalo de cálculo da linha de base dentro dos ciclos onde a fluorescência de fundo já estabilizou (verifique os dados "Resultados", "Componente") e a fluorescência do sinal ainda não tenha começado a aumentar, por ex. do ciclo 6 para o ciclo 15. Utilize o cálculo automático da linha de base configurando a opção "Linha de base auto".

**Curva de dissociação anómala**

<b>Causas possíveis</b>	<b>Soluções</b>
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.

**Com o ELITe InGenius® e o ELITe BeGenius®: Erro 30103**

<b>Causas possíveis</b>	<b>Soluções</b>
Concentração demasiado alta do alvo na amostra.	Se for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR: - repita a amplificação da amostra eluída em água de qualidade para biologia molecular, numa sessão "Apenas PCR" ou - repita a extração com uma diluição da amostra primária em água de qualidade para biologia molecular, numa sessão "Extração+PCR".

SÍMBOLOS

NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA  
LIMITADA

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

Este produto contém reagentes com licença do LTC.

Este produto é vendido ao abrigo de acordos de licenciamento celebrados entre a ELITechGroup S.p.A. as respetivas sucursais e o LTC. O preço de compra deste produto inclui direitos exclusivos, não transmissíveis, de utilização apenas desta quantidade do produto exclusivamente para atividades do comprador que estejam diretamente relacionadas com diagnósticos em humanos. Para obter mais informações sobre a aquisição de uma licença deste produto para outros fins que não os acima indicados, contacte o Licensing Department, LTC Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Telefone: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. E-mail: outlicensing@LTC.com.

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

Esta licença limitada permite à pessoa, ou entidade legal à qual este produto foi fornecido, usar o produto e os dados gerados pela utilização do produto, apenas para diagnóstico humano. Nem o ELITechGroup S.p.A. nem os respetivos licenciados 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.

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

Ficol® é uma marca comercial registada da GE Healthcare.

# HSV1 ELITE MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS031PLD



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

## A. Intended use

The «**HSV1 ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of type 1 Herpes Simplex human virus (HSV1)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV1 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with the instruments **ELITE InGenius®** and **ELITE BeGenius®**.

## B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HSV1	Glicoprotein D (gpD)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

## C. Validated matrix

- › Whole Blood EDTA, Plasma EDTA, CSF

## D. Kit content

**HSV1 Q-PCR Mix**

  
X 4

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

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

## E. Material required not provided in the kit

- › **ELITE InGenius®** instrument: INT030
- › **ELITE BeGenius®** instrument: INT040
- › **ELITE InGenius SP200** extraction cartridge: INT032SP200
- › **ELITE InGenius PCR Cassette** amplification cartridge: INT035PCR
- › **ELITE InGenius SP200 Consumable Set** consumable for extraction: INT032CS
- › **HSV1 - ELITE Standard:** STD031PLD
- › **HSV1 - ELITE Positive Control:** CTR031PLD
- › **CPE – Internal Control:** CTRCPE
- › **ELITE InGenius Waste Box:** F2102-000
- › **300 µL Filter Tips Axygen:** TF-350-L-R-S
- › **1000 µL Filter Tips Tecan :** 30180118

## F. Protocol

- |                               |        |                               |           |
|-------------------------------|--------|-------------------------------|-----------|
| › Sample volume               | 200 µL | › Unit of quantitative result | Copies/mL |
| › CPE Internal Control volume | 10 µL  | › Frequency of controls       | 15 days   |
| › Total eluate volume         | 100 µL | › Frequency of calibration    | 60 days   |
| › PCR eluate input volume     | 20 µL  |                               |           |
| › Q-PCR Mix volume            | 20 µL  |                               |           |

## G. Performance ELITE InGenius® and ELITE BeGenius®

Matrix	Limit of Detection	Linearity Range	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	211 cp / mL	211 – 25,000,000	98% 49/50*	100% 34/34*
Plasma	250 cp /mL	250 – 25,000,000	100% 30/30*	100% 38/38*
CSF	250 cp / mL	250 – 25,000,000	100% 20/20*	100% 22/22*

\*confirmed samples/ tested samples

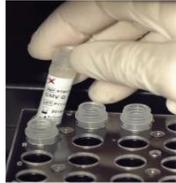
## H. Procedures ELITE InGenius®

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

<p>1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"</p>	<p>2. Verify calibrators: HSV1 Q-PCR Standard in the "Calibration menu" Verify controls: HSV1 positive and negative controls in the "Control menu" <i>N.B:</i> Both have been run, approved and not expired</p>	<p>3. Thaw the Q- PCR-Mix and the Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec</p>
---	---	--

### Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

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

### Procedure 2 - PCR only

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

### Procedure 3 - Extraction only

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

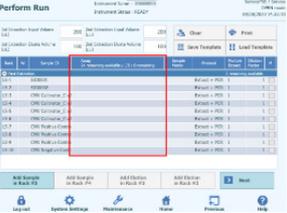
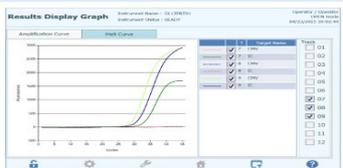
## L. Procedures ELITE BeGenius<sup>®</sup>

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

<p><b>1.</b> Switch on ELITE BeGenius Identification with username and password Select the mode “Closed”</p>	<p><b>2.</b> Verify calibrators: HSV1 Q-PCR standard in the “Calibration menu” Verify controls: HSV1 pos. and neg. controls in the “Control menu” <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired</p>	<p><b>3.</b> Thaw the HSV1 Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec</p>
--	---	---

### Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

<p><b>1.</b> Select “Perform Run” on the touch screen and then click on the run mode «Extraction and PCR»</p> 	<p><b>2.</b> Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active</p> 	<p><b>3.</b> Verify the extraction volumes: Input: “200 µL”, Eluate: “100 µL”</p> 
<p><b>4.</b> Select the “Assay protocol” of interest</p>  <p><b>Note:</b> if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4</p>	<p><b>5.</b> Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area</p> 	<p><b>6.</b> Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in Reagent Rack and insert it in the cooling area</p> 
<p><b>7.</b> Load: Filter Tips, Extraction rack, and PCR rack</p> 	<p><b>8.</b> Close the door. Start the run</p> 	<p><b>9.</b> View, approve and store the results</p> 

### Procedure 2 - PCR only

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

### Procedure 3 - Extraction only

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

# HSV1 ELITE MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Ref: RTS031PLD



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

## A. Intended use

The «**HSV1 ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of type 1 Herpes Simplex human virus (HSV1)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV1 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with **ABI PCR thermal cyclers** (Thermo-Fisher) and the following extraction systems: **ELITE STAR** (ELITechGroup), **ELITE GALAXY** (ELITechGroup), **easyMAG** (BioMérieux) or **QIASymphony** (Qiagen).

## B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
<b>HSV1</b>	Glicoprotein D (gpD)	FAM
<b>Internal Control</b>	Human beta globin gene	AP525

## C. Validated matrix

› Whole blood EDTA

› Plasma EDTA

› Cerebrospinal fluid

## D. Kit content

### HSV1 Q-PCR Mix



X 4

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

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

## E. Material required not provided in the kit

- › 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
- ›

- › HSV1 ELITE Standard: STD031PLD
- › HSV1 - ELITE Positive Control: CTR031PLD
- › CPE - Internal Control: CTCRPE
- › easyMAG - Generic protocol 2.0.1
- › QIASymphony - DNA Mini kit or DSP Virus/Pathogen Midi kit
- › Molecular biology grade water

## F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ELITE STAR - ABI	Whole blood	<b>10 gEq/reaction</b>	<b>96%</b> (27/28)*	<b>97%</b> (28/29)*
	Plasma	<b>10 gEq/reaction</b>	<b>100%</b> (30/30)*	<b>100%</b> (30/30)
	CSF	<b>10 gEq/reaction</b>	<b>100%</b> (22/22)*	<b>100%</b> (24/24)*
ELITE GALAXY - ABI	Whole blood	<b>211 gEq/mL</b>	<b>100%</b> (30/30)*	<b>100%</b> (36/36)*
	Plasma	<b>95 gEq/mL</b>	<b>100%</b> (30/30)*	<b>100%</b> (34/34)*
	CSF	<b>10 gEq/reaction</b>	<b>100%</b> (20/20)*	<b>100%</b> (22/22)*

\*confirmed samples/tested samples

## G. Procedure

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

### Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELITE Star	WB, Plasma, CSF	200 µL	700 µL	100 µL	200 µL
ELITE Galaxy	WB, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	CSF, Plasma	500 µL	-	100 µL	5 µL
QIASymphony	Plasma	500 µL	100 µL	85 µL	6 µL

### Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

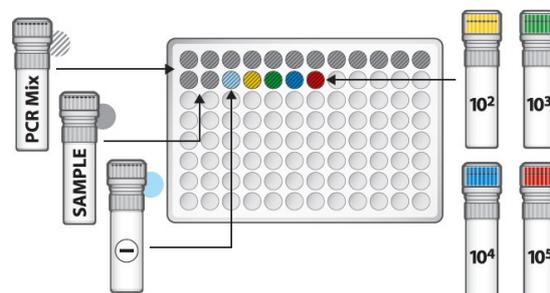
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "HSV1" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition 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 45 cycles	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
	72°C	20 sec

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

### Amplification - PCR Set-up

1. Thaw HSV1 Q-PCR Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet 20 µL of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add, 20 µL of extracted DNA in sample wells, 20 µL of molecular grade water in Negative Control well, and 20 µL of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



### Amplification – Baseline and Threshold for qualitative analysis

Instrument	Baseline	HSV1 FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	6 - 15	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	6 - 15	0.1	0.05

### Interpretation - Qualitative results

HSV1 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 HSV1 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 10<sup>6</sup> cp/reaction or approximately from 100 to 10<sup>7</sup> cp/mL.

# HSV-1 ELITE MGB® Kit used with Cobas-Z 480 PCR instruments

Ref.: RTS031PLD



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

## A. Intended use

The «**HSV1 ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for **the detection and quantification of the DNA of type 1 Herpes Simplex human virus (HSV1)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV1 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with **Cobas – Z 480 analyzer (Roche)** and the following extraction systems: **MagNA Pure 24 System**.

## B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HSV1	Glicoprotein D (gpD)	FAM
Internal Control	human beta globin gene	AP525

## C. Validated matrix

- › Whole blood EDTA
- › Plasma EDTA

## D. Kit content

**HSV1 Q-PCR Mix**



X 4

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

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

## E. Material required not provided in the kit

- › Cobas – Z 480 analyzer PCR Instrument
- › MagNA Pure 24 System, software 1.0
- › HSV1 - ELITE Positive Control: CTR031PLD
- › HSV1 ELITE Standard: STD031PLD
- › CPE Internal Control: CTRCPE

## F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole blood	<b>10 cp/reaction</b>	<b>100%</b> (29/29)*	<b>97.5%</b> (39/40)*
	Plasma	<b>10 cp/reaction</b>	<b>100%</b> (30/30)*	<b>100%</b> (34/34)*

\*confirmed samples/tested samples

## G. Procedure

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

### Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
MagNA Pure 24	WB, Plasma	200 µL	350 µL	100 µL	20 µL

### Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments

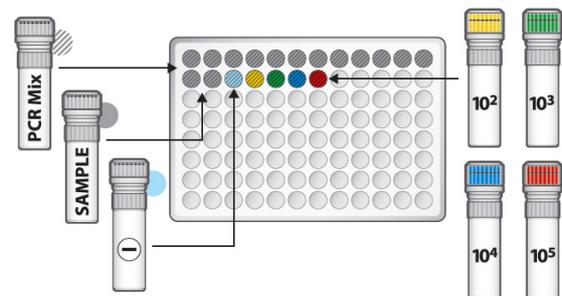
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "HSV1" detector with "FAM" and quencher "465 - 510"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "540 -580"

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

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

### Amplification - PCR Set-up

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



### Amplification – Background and Threshold for qualitative analysis\*

Instrument	Matrix	Background	HSV1 FAM	Internal Control VIC
Cobas-Z 480 PCR instruments	Plasma	2 - 6	0.55	1.2
Cobas-Z 480 PCR instruments	WB	2 - 6	0.8	1.5

*\*manually set the Threshold and Noiseband*

### Interpretation - Qualitative results

HSV-1 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 HSV1 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 10<sup>6</sup> copies/reaction or approximately from 100 to 10<sup>7</sup> copies/mL.

