




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

NOTICE of CHANGE dated 15/02/2023

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«VZV ELITe MGB® Kit» Ref. RTS035PLD

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

- *Update for the use of the product in association with «ELITe BeGenius» instrument (REF INT040) and CSF matrix.*
- *Description of IC cut off value already adopted in the Assay protocol of the product (section “Diagnostic specificity: confirmation of negative samples”)*
- *“Performance Characteristics ELITe InGenius and ELITe BeGenius” paragraph updated as per:*
 - *confirmed LoD value calculated on CSF matrix*
 - *typos.*

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

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto **VZV ELITe MGB® Kit** faz parte de um ensaio qualitativo e quantitativo da amplificação de ácidos nucleicos para a **deteção e quantificação do ADN do vírus humano varicela herpes-zoster (VZV)** 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 VZV, junto com dados clínicos do doente e outros resultados de testes de laboratório.

PRINCÍPIOS DO ENSAIO

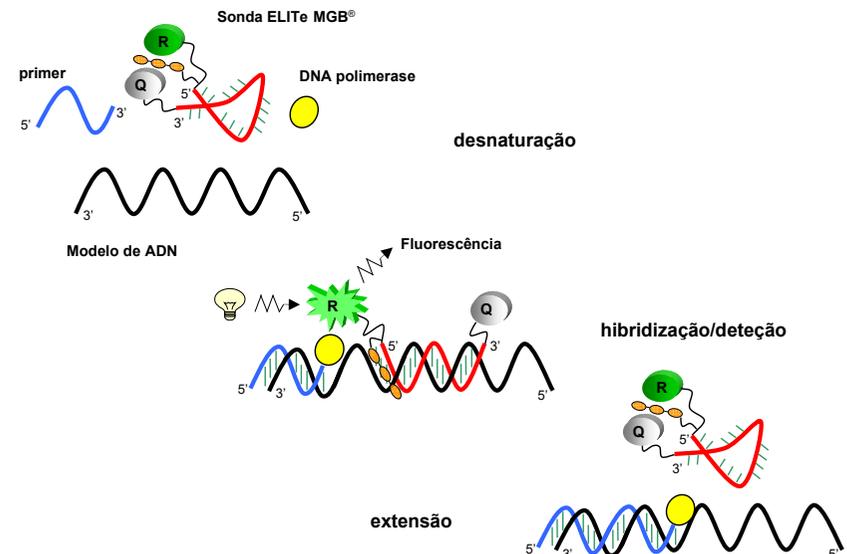
O ensaio consiste numa reação de amplificação em tempo real com um termóstato programável fornecido com um sistema ótico de deteção de fluorescência (termociclador de amplificação em tempo real).

Em cada furo, são realizadas duas reações de amplificação a partir do ADN extraído das amostras a serem testadas: uma reação específica para uma região do gene da **proteína de ligação de ADN principal** (ORF 29) do VZV e uma reação específica para uma região do gene **beta Globina** humano (Controlo Interno da inibição). A sonda específica do VZV com tecnologia ELITe MGB®, etiquetada com fluoróforo FAM, é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação do VZV. 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 do 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 VZV 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 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.



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

REF RTS035PLD

CE IVD

-20°C

ÍNDICE

UTILIZAÇÃO PREVISTA	página 2
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 DO ELITE INGENIUS	página 8
ELITe BEGENIUS	página 15
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 15
PROCEDIMENTO DO ELITe BEGENIUS	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 33
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 33
PROCEDIMENTO	página 35
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	página 43
Roche cobas z 480 analyzer	página 49
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 49
PROCEDIMENTO	página 50
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	página 55
REFERÊNCIAS	página 58
LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	página 58
RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	página 59
SÍMBOLOS	página 61
NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	página 62

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto **VZV ELITe MGB® Kit** fornece a mistura completa **pronta a usar** VZV 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** em associação com o **ELITe InGenius®** e **ELITe BeGenius®** e **25 testes** em associação com outros sistemas.

Os primários e a sonda específica do VZV (estabilizado pelo grupo MGB®, etiquetado com fluoróforo FAM e extinto por uma molécula não fluorescente) são específicos para uma região do gene da **proteína de ligação ao ADN principal** (ORF 29) do VZV.

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

A mistura de reação fornece tampão, cloreto de magnésio, trifosfatos nucleótidos, fluoróforo AP593, usado em vez de ROX ou CY5 como referência passiva para normalização da fluorescência, a enzima Uracil-N-glicosidase (UNG) para inativar a contaminação pelo produto de amplificação, a enzima de polimerase de ADN de "arranque a quente".

O produto é suficiente para **96 testes em associação com o ELITe InGenius®** e o **ELITe BeGenius®** incluindo standards e comandos.

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

MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

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

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- Câmara de fluxo laminar.
- Luvas sem pó de nitrilo 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 (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 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 «Pontas de filtro 300 µL Axygen» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, ref. TF-350-L-R-S).

Para a extração de ADN automática, a amplificação em tempo real e a interpretação dos resultados das amostras com o **ELITe BeGenius** e são necessários os seguintes protocolos de ensaio específicos (ELITechGroup S.p.A.):

- parâmetros para os calibradores **VZV ELITe_STD**,
- parâmetros para a amplificação de Positive Control **VZV ELITe_PC**,
- parâmetros para amplificação de Negative Control **VZV ELITe_NC**,
- parâmetros para a análise de amostras **VZV ELITe_WB_200_100**, **VZV ELITe_PL_200_100** e **VZV ELITe-CSF_200_100**.

Para uma análise automática da amostra com o instrumento **ELITe BeGenius** (ELITechGroup S.p.A., ref. INT040) é requerida 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 em tempo real e a interpretação dos resultados das amostras, é necessário o instrumento **ELITe BeGenius** (ELITechGroup S.p.A., ref. INT040), os seguintes Protocolos de ensaio específicos (ELITechGroup S.p.A.):

- parâmetros para os calibradores **VZV ELITe_Be_STD**,
- parâmetros para a amplificação de Positive Control **VZV ELITe_Be_PC**,
- parâmetros para amplificação de Negative Control **VZV ELITe_Be_NC**,
- parâmetros para a análise de amostras **VZV ELITe_Be_WB_200_100**, **VZV ELITe_Be_PL_200_100** e **VZV 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 micropalcos 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 de ADN automática 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. 37055), kits para extração de ácido nucleico de amostras biológicas, com o instrumento **QIASymphony® SPI/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 positivo control 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.

Quando for usado o Sistema de PCR em tempo real 7300 para amplificação de ADN, é necessário usar o produto genérico **MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate** (Life Technologies., ref. N8010560), micropalcos com furos de 0,2 mL e folhas vedantes adesivas para amplificação em tempo real.

Quando for usado o 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument para amplificação de ADN, é necessário usar o produto genérico **MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL** (Life Technologies., ref. 43469062), micropalcos com furos de 0,1 mL e folhas vedantes adesivas para amplificação em tempo real.

VZV ELITe MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS035PLD

Quando for usado um copo 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 detecção de ADN de VZV (análise qualitativa), use o produto **VZV - ELITe Positive Control** (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR035PLD), ou o produto **VZV - ELITe Positive Control RF** (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR035PLD-R), específico para utilização com copos z 480 analyzer, positive control de ADN de plasmídeo.

Se for necessária a detecção e quantificação de ADN de VZV para análise quantitativa, use o produto **VZV ELITe Standard** (ELITechGroup S.p.A., ref. STD035PLD), quatro diluições de ADN de plasmídeo de quantidade conhecida para obter a curva standard.

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 hipoclorito de sódio (lixívia) a 3% ou em autoclave durante uma hora a 121 °C antes da eliminação. Não permita que os reagentes de extração entrem em contacto com hipoclorito de sódio (lixívia).

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 no produto antes de efetuar o ensaio.

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

Não utilize o produto após a data de validade indicada.

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

Não misture 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 detecção de ácidos nucleicos, 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.

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

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/detecção 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/detecção de produtos de amplificação. Nunca transfira batas, luvas ou ferramentas de laboratório da área designada para a amplificação/detecção 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

VZV ELITe MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS035PLD

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

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 **VZV Q - PCR Mix** deve ser guardada a uma temperatura inferior a -20 °C e ao abrigo da luz.

A **VZV Q - PCR Mix** deve ser utilizada no prazo de um mês após a primeira abertura.

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

A **VZV Q - 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.

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 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 o protocolo de extração **VZV 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.

Nota: quando a extração de ADN de 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 **VZV 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.

Nota: quando a extração de ARN do líquido cefalorraquidiano 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 de **VZV 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.

Para a análise com este produto, devem ser transferidos 0,2 mL da amostra ressuspensa para o **Extraction tube** fornecido com o **ELITe InGenius SP 200 Consumable Set** ou um **2 mL Tube** (Sarstedt, ref. 72.694.005).

Nota: A utilização da pipeta em amostras do tubo principal para o **Extraction tube** pode **gerar contaminação**. Utilize as pipetas adequadas e siga todas as recomendações reportadas na secção **“Advertências e precauções”**.

Outras amostras:

Não existem dados disponíveis relativos aos desempenhos do produto com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: zangatoas de lesões mucocutâneas, 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

Tem de ser gerada e aprovada para cada lote de reagente de PCR a validação do reagente.

- para a calibração, use os quatro níveis de concentração de **VZV ELITe Standard**, o protocolo de ensaio **VZV ELITe_STD**.
- para o positivo control, use o produto **VZV - ELITe Positive Control** com o protocolo do ensaio **VZV ELITe_PC**.
- para o negativo control, use água de grau molecular (não fornecida com este kit) com o protocolo de ensaio **VZV ELITe_NC**.

Nota: O **ELITe InGenius** permite a geração e o armazenamento da curva de calibração e a validação do controlo de PCR para cada lote de reagente de PCR.

Os resultados das curvas de calibração expiram após **60 dias**, e nesse momento, é necessário fazer uma nova execução dos Q-PCR Standards em associação com o lote do reagente de amplificação.

Os resultados do controlo da PCR expiram após **15 dias** e, nesse momento, é necessário voltar a executar os positivo controls e negativo controlos 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 usado um novo lote de reagentes,
- os resultados da análise de controlo da qualidade (ver o parágrafo seguinte) se encontrarem fora da especificação,
- for realizada qualquer manutenção ou assistência significativa no instrumento.

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 do ELITe InGenius

A utilização do **VZV 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, e através da consulta da documentação do instrumento, é necessário:

- ligar o **ELITe InGenius** e iniciar sessão no modo **“CLOSED”**;
- verificar se os Calibradores (**VZV Q - PCR Standard**) estão aprovados e válidos (Estado) para o lote da **VZV Q - PCR Mix** a ser utilizada. Caso não haja calibradores de amplificação válidos disponíveis para o lote da **VZV Q - PCR Mix**, execute os calibradores da amplificação conforme descrito de seguida,
- verificar se os controlos da amplificação (**VZV Positive Control**, **VZV Negative Control**) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de **VZV Q-PCR Mix** a ser utilizado. Caso não haja controlos de amplificação válidos disponíveis para o lote da **VZV Q - PCR Mix**, execute os controlos da amplificação conforme descrito de seguida,
- 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 teste da amostra com o produto **VZV ELITe MGB Kit** estão descritos na tabela seguinte.

Protocolo de ensaio para o VZV ELITe MGB Kit			
Nome	Matriz	Unidade do relatório	Características
VZV 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 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
VZV 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 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL
VZV ELITe_CSF_200_100	LCR	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO 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 **VZV ELITe MGB Kit** em associação com o **ELITE InGenius** pode ser usado para:

- 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 requeridos estão incluídos no Protocolo de ensaio disponível no instrumento e são automaticamente carregados quando o protocolo de ensaio é selecionado.

Nota: O sistema ELITE InGenius pode ser ligado ao "Laboratory Information System" (servidor de informação da localização - LIS), que permite carregar a informação da sessão. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

Estão descritos a seguir os passos principais para a preparação dos quatro 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:

- Aqueça as amostras até à temperatura ambiente (~+25 °C) e manuseie-as de acordo com as diretrizes laboratoriais e com a secção "Amostras e Controlos".
- Descongele os tubos da VZV Q - PCR Mix necessários à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Proteja a **VZV Q - PCR Mix** da luz enquanto a aquece, dado que este reagente é fotossensível.

- Descongele os tubos CPE para a sessão. Cada tubo é suficiente para 12 extrações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
- Certifique-se de que o Volume de entrada de extração é de 200 µL e que o Volume de eluição extraído 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" (isto é, VZV ELITe_PL_200_100).
- Certifique-se de que o "Protocol" apresentado é: "Extract + PCR".
- Selecione a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position":
 - se for usado um tubo primário, selecione "Tubo primário",
 - se for usado um tubo secundário, selecione "Extraction Tube".Selecione "Next" para continuar a preparação.
- Carregue CPE e VZV Q-PCR Mix no "Inventory Block" designado consultando a Lista de Carga e introduza o número de lote, data de validade e o número de reações para cada tubo. Selecione "Next" para continuar.
- Verifique as pontas nos "Tip Racks" na "Inventory Area" e substitua o Rack(s) de pontas, se necessário. Selecione "Next" para continuar.
- 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. Selecione "Next" para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione "Start" para iniciar a execução.

Quando a sessão é concluída, 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 pode 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 outros consumíveis têm de ser eliminados em conformidade com todos os regulamentos governamentais e ambientais seguintes. 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 da amplificação a iniciar a partir de amostras eluídas, realize os passos seguintes consultando a GUI:

- Se necessário, descongele as amostras de ácidos nucleicos extraídas à temperatura ambiente (~+25 °C).
- Descongele os tubos da VZV Q - PCR Mix necessários à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 24 reações em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Proteja a VZV Q - PCR Mix da luz enquanto a aquece, dado que este reagente é fotossensível.

- Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
- Certifique-se de que o Volume de entrada de extração é de 200 µL e que o Volume de eluição extraído é de 100 µL.
- Para cada Rastreo de interesse introduza a "SampleID" (SID) digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
- Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (isto é, VZV ELITe_PL_200_100).
- Selecione "PCR Only" (apenas PCR) na coluna "Protocol".
- Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra eluída na coluna "Sample Position" é "ExtraTube (fila inferior)". Selecione "Next" para continuar a preparação.
- Carregue VZV Q-PCR Mix no "Inventory Block" designado consultando a Lista de Carga e introduza o número de lote, data de validade e o número de reações para cada tubo. Selecione "Next" para continuar.
- Verifique as pontas nos "Tip Racks" na "Inventory Area" e substitua o Rack(s) de pontas, se necessário. Selecione "Next" para continuar.
- Carregue as "**PCR Cassettes**" e as amostras de ácido nucleico extraídas seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione "Start" para iniciar a execução.

Quando a sessão é concluída, 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 pode ser removida do instrumento, tapada e guardada a -20 °C. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da execução, as PCR Cassettes e os consumíveis têm de ser eliminados seguindo todos os regulamentos governamentais e 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 configurar a amplificação da calibração, realize os passos seguintes consultando a GUI:

1. Descongele os tubos da VZV Q - PCR Mix necessários à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Proteja a VZV Q - PCR Mix da luz enquanto a aquece, dado que este reagente é fotossensível.

2. Descongele os tubos VZV Q - PCR Standard (Cal1: VZV Q-PCR Standards 10², Cal2: VZV Q-PCR Standards 10³, Cal3: VZV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: VZV Q-PCR Standards 10⁵) 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 screen".
4. Certifique-se de que o Volume de entrada de extração é de 200 µL e que o Volume de eluição extraído é de 100 µL.
5. Atribua o Rastreamento, selecione o Protocolo do Ensaio "VZV ELITe STD" na coluna "Assay" e introduza o número de lote e a data de expiração do reagente. Selecione "Next" para continuar.
6. Carregue VZV Q-PCR Mix no "Inventory Block" designado consultando a Lista de Carga e introduza o número de lote, data de validade e o número de reações para cada tubo. Selecione "Next" para continuar.
7. Verifique as pontas nos "Tip Racks" na "Inventory Area" e substitua o Rack(s) de pontas, se necessário. Selecione "Next" para continuar.
8. Carregue os tubos do **Calibrador** e as **PCR Cassettes**, seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação. Tenha o cuidado de carregar o fluido PCR Standard nos rastreios corretos como indicado na GUI.
9. Feche a porta do instrumento.
10. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

Quando o sistema estiver parado, é possível abrir a porta (Fim da execução) e remover os consumíveis do instrumento.

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

Nota: Os Calibradores podem ser usados para 4 sessões separadas de 3 horas cada.

Nota: No final da execução, as PCR Cassettes e os outros consumíveis têm de ser eliminados seguindo todos os regulamentos governamentais e 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.

D. Execução de amplificação para Controlo Positivo e Controlo Negativo

Para configurar a execução da amplificação para o Controlo Positivo e Controlo Negativo, execute os passos seguintes consultando a GUI:

1. Descongele os tubos da VZV Q - PCR Mix necessários à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 24 reações em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Proteja a VZV Q - PCR Mix da luz enquanto a aquece, dado que este reagente é fotossensível.

2. Descongele o produto VZV - Positive Control à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Prepare o VZV Negative Control transferindo pelo menos 50 µL de água de grau de biologia molecular para um "Elution tube", fornecido com o **ELITE InGenius SP 200 Consumable Set**.
4. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
5. Para o positive control, atribua o Rastreamento, selecione o Protocolo do Ensaio "VZV

6. Para o negative control, atribua o Rastreamento, selecione o Protocolo do Ensaio "VZV ELITe NC" na coluna "Assay" e introduza o número de lote e a data de expiração do reagente. Clique em "Seguinte" para continuar a configuração.
7. Carregue VZV Q-PCR Mix no "Inventory Block" selecionado designado consultando a Lista de Carga e introduza o número de lote, data de validade e o número de reações para cada tubo. Selecione "Next" para continuar.
8. Verifique as pontas nos "Tip Racks" na "Inventory Area" e substitua o Rack(s) de pontas, se necessário. Selecione "Next" para continuar.
9. Carregue a **PCR Cassette**, o tubo de **Positive Control** e o tubo de **Negative Control** seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
10. Feche a porta do instrumento.
11. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Quando a sessão é concluída, o **ELITE InGenius** permite 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: O Controlo Positivo pode ser usado para 4 sessões separadas de 3 horas cada.

Nota: No final da execução, as PCR Cassettes e os outros consumíveis têm de ser eliminados seguindo todos os regulamentos governamentais e 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

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

No final da execução, é automaticamente apresentado o ecrã "Results Display". 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"). Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

Nota: O **ELITE InGenius** pode ser ligado ao "Sistema de Informações Laboratoriais" (LIS), que permite carregar os resultados da sessão no centro de dados laboratoriais. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

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

O **ELITE InGenius** gera os resultados utilizando o **VZV 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.

A. Validação da Curva de calibração

O **ELITE InGenius software** interpreta os resultados da PCR para a sonda específica de VZV ("VZV") e sonda de controlo interno específica ("CI") na reação de amplificação dos calibradores com os parâmetros do protocolo de ensaio do VZV ELITe STD. Os valores de Ct resultantes são usados para validar o sistema (lote de reagentes e instrumento)".

A Curva de calibração, específica para o lote de reagente de PCR, é guardada na base de dados (controles). Podem ser visualizados e aprovados pelo "Administrator" ou "Analyst", seguindo as instruções na GUI.

Os resultados da curva da calibração expiram **após 60 dias**.

Antes de analisar qualquer amostra, é obrigatório verificar se a curva de calibração está aprovada e válida para o lote de reagente de PCR. O estado dos resultados do positive control e do negative control para cada lote de reagente de PCR é mostrado no módulo "Controles". Se os resultados do Positive Control e/ou do Negative Control estiverem em falta ou expiraram, execute o controlo(s) conforme descrito anteriormente.

Nota: Se a curva de calibração não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem "Failed" no ecrã "Calibration". Neste caso, os resultados não podem ser aprovados e têm de ser repetidas as reações de amplificação do Calibrador.

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

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

O **ELITe InGenius software** interpreta os resultados da PCR para a sonda específica de VZV ("VZV") e sonda de controlo interno específica ("CI") na reação de amplificação do positive control e negative control com os parâmetros do protocolo de ensaio VZV ELITe_PC e VZV ELITe_NC. Os valores de Ct resultantes são usados para validar o sistema (lote de reagentes e instrumento).

Os resultados do Positive Control e Negative Control, específicos para o lote de reagente de PCR, são registados na base de dados (Controles). Podem ser visualizados e aprovados pelo "Administrator" ou "Analyst", seguindo as instruções na GUI.

Os resultados do positive control e negative control expiram após **15 dias**.

Antes de analisar qualquer amostra, é obrigatório verificar se os resultados do positive control e do negative control estão aprovados e válidos para o lote de reagente de PCR. O estado dos resultados do positive control e do negative control para cada lote de reagente de PCR é mostrado no módulo "Controles". Se os resultados do Positive Control e/ou do Negative Control estiverem em falta ou expiraram, execute o controlo(s) conforme descrito anteriormente.

O **ELITe InGenius software** processa os resultados do positive control e do negative control e gera os Gráficos de Controlo. São usados quatro resultados de Controlo Positivo e do Controlo Negativo aprovados para preparar o "Gráfico de controlo" inicial. Para controlos posteriores, os resultados são analisados pelo software para garantir que os desempenhos do sistema se encontram dentro dos critérios de aceitação, mostrados nos gráficos Gráfico de Controlo. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

Nota: Se o resultado do Controlo Positivo e do Controlo Negativo não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem "Failed" no ecrã "Controls". Neste caso, os resultados não podem ser aprovados e as execuções de positive control e do negative control têm de ser repetidas.

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

C. Validação dos resultados das amostras

O **ELITe InGenius software** interpreta os resultados da PCR para a sonda VZV (canal "VZV") e a sonda de Controlo Interno (Canal "IC") com os parâmetros do protocolo do ensaio VZV ELITe_WB_200_100, VZV ELITe_PL_200_100 e VZV ELITe_CSF_200_100. Os valores Ct do VZV resultante são convertidos em concentração.

Os resultados são mostrados no módulo "Result Display".

A execução da amostra pode ser aprovada quando forem satisfeitas as três condições reportadas na tabela abaixo.

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

Os resultados da amostra são automaticamente interpretados pelo **ELITe InGenius software** usando os parâmetros do protocolo do ensaio. Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado.

Resultado da execução da amostra	Interpretação
VZV: ADN detetado, quantidade igual a XXX cópias/mL	ADN VZV detetado no intervalo de medição do ensaio, quantidade como mostrado.
VZV: ADN detetado, quantidade inferior a LLoQ cópias/mL	ADN VZV detetado abaixo do limite inferior de quantificação do ensaio
VZV: ADN detetado, quantidade além de ULoQ cópias/mL	ADN VZV detetado além do limite superior de quantificação do ensaio
VZV: ADN não detetado ou inferior a LoD cópias/mL	Não foi detetado ADN de VZV na amostra. A amostra é negativa para ARN de VZV ou a sua concentração está abaixo do Limite de deteção do ensaio.
Inválido - Voltar a testar a amostra	Resultado do ensaio inválido devido a falha do Controlo Interno devido a, nomeadamente, extração incorreta, transferência de inibidores). O teste deve ser repetido.

Amostras reportadas como "VZV: ADN detetado, quantidade abaixo do LIdQ" não são adequadas para quantificação. A concentração de VZV: O ADN detetado na amostra é inferior ao nível a que pode ser quantificada com exatidão. Se a amostra tiver sido diluída antes da extração ou PCR, pode ser novamente testada sem diluição.

Amostras reportadas como "VZV: ADN detetado, quantidade acima do LSdQ" não são adequadas para quantificação. A concentração de ADN de VZV detetada na amostra é superior ao nível a que pode ser quantificada com precisão. A amostra pode ser diluída antes da extração ou PCR e novamente testada para oferecer resultados dentro do intervalo linear do ensaio.

As amostras reportadas como "VZV DNA Not Detected or below LoD" são adequadas para análise mas não foi detetado ADN de VZV. Neste caso, a amostra pode ser negativa para ADN de VZV ou o ADN de VZV está presente numa concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver "Características de desempenho").

As amostras positivas para ADN de VZV a uma concentração inferior ao LoD, são comunicadas como "VZV: ADN detetado, quantidade inferior ao LLoQ" (consulte "Características de desempenho").

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

Se subsistir volume da eluição suficiente, o eluato pode ser novamente testado (tal como está ou diluído) através de uma execução da amplificação no modo "PCR Only" (apenas PCR). Se o segundo resultado for inválido, a amostra deve ser novamente testada começando a partir da extração de uma nova amostra utilizando o modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

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 "Administrator" 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 congelamento e descongelamento. Quando utilizar amostras congeladas, descongele as mesmas apenas 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 **ELITe BeGenius Software** versão **2.0.0** (ou versões equivalentes posteriores), use o protocolo de extração **VZV ELITe_Be_WB_200_100** Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o **CPE Internal Control** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

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

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 congelamento, para evitar ciclos repetidos de congelamento e descongelamento. 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 **ELITe BeGenius Software** versão **2.0.0** (ou versões equivalentes posteriores), use o protocolo de extração **VZV ELITe_Be_PL_200_100** Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o **CPE Internal Control** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

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

Líquido cefalorraquidiano

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 congelamento e descongelamento. 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 ARN do líquido cefalorraquidiano for realizada com o **ELITe BeGenius** e com o **ELITe BeGenius Software** versão **2.0.0** (ou versões equivalentes mais recentes), use os protocolos de extração de **VZV 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.

Outras amostras:

Neste momento não existem dados disponíveis relativos ao desempenho do produto com outras amostras clínicas, tais como: zaragatoas de lesões mucocutâneas, 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 imunossupressores.

Calibradores da amplificação e controlos da amplificação

Tem de ser gerada e aprovada para cada lote de reagente de PCR a validação do reagente.

- Para o conjunto calibrador, use os quatro níveis de concentração de **VZV ELITe Standard**, o protocolo de ensaio **VZV ELITe_Be_STD** para o **ELITe BeGenius**,
- Para o positive control, use o produto **VZV - ELITe Positive Control** com o protocolo do ensaio **VZV ELITe_Be_PC** para o **ELITe BeGenius**,
- para o negative control, use água de grau molecular (não fornecida com este kit) com o protocolo de ensaio **VZV ELITe_Be_NC** para o **ELITe BeGenius**,

Nota: O **ELITe BeGenius** permite a geração e o armazenamento da curva de calibração e a validação do controlo de PCR para cada lote de reagente de PCR.

Os resultados das curvas de calibração expiram após **60 dias**, e nesse momento, é necessário fazer uma nova execução dos Q-PCR Standards em associação com o lote do reagente de amplificação.

Os resultados do controlo da amplificação expiram após **15 dias**, e nesse momento, é necessário fazer uma nova execução dos Q-PCR Standards 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 usado um novo lote de reagentes,
- os resultados da análise de controlo da qualidade (ver o parágrafo seguinte) se encontrarem fora da especificação,
- for realizada qualquer manutenção significativa no instrumento.

Controlos da qualidade

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 do ELITe BeGenius

O uso do **VZV ELITe MGB Kit** com o **ELITe BeGenius** 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:

- ligue o **ELITe BeGenius** e inicie sessão no modo "CLOSED";
- verifique se os calibradores da amplificação (**VZV Q-PCR Standard**) estão aprovados e válidos (Estado) para o lote de **VZV Q-PCR Mix** a ser utilizado. Caso não haja calibradores válidos para o lote **VZV Q-PCR Mix**, realize a calibração conforme descrito de seguida,
- verifique se os controlos da amplificação (**VZV Positive Control**, **VZV Negative Control**) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de **VZV Q-PCR Mix** a ser utilizado. Caso não haja controlos da amplificação válidos disponíveis para o lote da **VZV Q-PCR Mix**, execute os controlos conforme descrito de seguida,
- escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela ELITechGroup S.p.A. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os ELITe MGB kits e o instrumento **ELITe BeGenius** com as matrizes indicadas.

Os protocolos de ensaio disponíveis para teste da amostra com o produto **VZV ELITe MGB Kit** estão descritos na tabela seguinte.

Protocolos de ensaio para o VZV ELITe MGB Kit e o ELITe InGenius			
Nome	Matriz	Unidade do relatório	Características
VZV 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
VZV 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
VZV 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.

Os protocolos para análise qualitativa estão disponíveis a pedido.

Preparação da sessão

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

- A. Execução integrada, (EXTR + PCR),
- B. Execução de amplificação (PCR Only) (apenas PCR),
- C. Execução da calibração (PCR Only) (apenas PCR),
- D. Execução de amplificação para execução de Positive e Negative Control (PCR only) (apenas PCR).

Todos os parâmetros requeridos 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 "Laboratory Information System" (servidor de informação da localização - LIS), que permite carregar a informação da sessão. 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 integrada (Extract + PCR) (Extração + PCR)

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

1. Identifique as amostras necessárias e manuseie-as de acordo com as diretrizes laboratoriais e com a secção "Sample and Controls".
2. Descongele os tubos da **VZV Q-PCR Mix** necessários à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 24 reações em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Descongele os tubos de CPE necessários à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 12 extrações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
4. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
5. Retire os Suportes da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
6. Selecione o modo de execução: "Extract + PCR".
7. Carregue as amostras no "Sample Rack".

Nota: Quando os tubos secundários "2 mL Tube" forem carregados, use adaptadores azuis para o "Sample Rack".

8. Insira o "Sample Rack" na "Cooler Unit", começando a partir da "Lane 5" (L5) seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar.
9. Se necessário, insira a "Sample ID" (SID) para cada "Position" usada.

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

10. Certifique-se de que o Volume de entrada de extração é de 200 µL e que o "Volume de eluição da extração" é de 100 µL.
11. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Ensaio" (isto é, **VZV ELITe_Be_WB_200_100**). Selecione "Next" para continuar a preparação.
12. Carregue os "Elution tubes" no "Elution Rack".

Nota: Os tubos de eluição podem ser identificados com código de barras para melhorar a rastreabilidade.

13. Insira o "Elution Rack" na "Cooler Unit", começando a partir da "Lane 3" (L3) seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar.
14. Carregue **CPE** e **VZV Q-PCR Mix** no "Reagent/Elution Rack".
15. Insira o "Reagent/Elution Rack" na "Cooler Unit", na "Lane 2" (L2) seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar.
16. Se necessário, para cada reagente de PCR Mix, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).
17. Verifique as pontas nos "Tip Racks" na "Inventory Area" e substitua o suporte(s) de pontas, se necessário. Selecione "Next" para continuar.
18. Carregue o "PCR Basket" com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar.

- Carregue o “**Extraction Basket**” com os cartuchos de extração **ELITe InGenius SP 200** e os consumíveis de extração necessários seguindo as instruções na GUI. Selecione “Next” para continuar.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione “Start” para iniciar a execução.

Quando a sessão é concluída, o **ELITe BeGenius** 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, identificada e guardada a -20 °C.

Nota: No final da execução, as **PCR Cassette** e os consumíveis têm de ser eliminados seguindo todos os regulamentos governamentais e 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 na Unidade Refrigeradora durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Antes de começar uma nova sessão, misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos

B. Execução de amplificação (apenas PCR)

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

- Se necessário, descongele as amostras diluídas à temperatura ambiente (~+25 °C). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos
- Descongele os tubos da **VZV Q - PCR Mix** necessários à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 24 reações em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Proteja a **VZV Q - PCR Mix** da luz enquanto a aquece, dado que este reagente é fotossensível.

- Selecione “Perform Run” a partir do ecrã “Home screen”.
- Retire os “**Racks**” de “Lane 1, 2 and 3” (L1, L2, L3) da “Cooler Unit” e coloque-os na mesa de preparação.
- Selecione o “Run mode: PCR Only”
- Carregue as amostras no “**Elution Rack**”.
- Insira o “**Elution Rack**” na “Cooler Unit”, começando a partir da “Lane 3” (L3) seguindo as instruções na GUI.
- Se necessário, para cada “Position”, insira a “Sample ID”, a “Sample matrix”, o “Extraction kit” e o the “Extracted eluate vol.” (volume de eluato extraído).
- Certifique-se de que o “Extraction Input Volume” é de 200 µL e que o “Extraction Elute Volume” é de 100 µL, mesmo se a extração não estiver a ser realizada.
- Selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna “Assay” (por ex., **VZV ELITe_Be_WB_200_100**). Selecione “Next” para continuar.
- Carregue a **VZV Q-PCR Mix** no “Reagent/Elution Rack”.
- Insira o “**Reagent/Elution Rack**” na “Cooler Unit”, na “Lane 2” (L2) seguindo as instruções na GUI. Selecione “Next” para continuar.
- Se necessário, para cada reagente de PCR Mix, insira o “S/N” (número de série), o “Lot No.” (número de lote), a “Exp. Date” (data de expiração) e o “T/R” (número de reações).
- Verifique as pontas nos “**Tip Racks**” na “Inventory Area” e substitua o suporte(s) de pontas, se necessário. Selecione “Next” para continuar.
- Carregue o “**PCR Basket**” com “**PCR Cassette**” na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Selecione “Next” para continuar.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione “Start” para iniciar a execução.

Quando a sessão é concluída, o **ELITe BeGenius** 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, identificada e guardada a -20 °C durante um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da execução, as **PCR Cassettes** e os consumíveis têm de ser eliminados em conformidade com todos os regulamentos governamentais e ambientais seguintes. 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 na Unidade Refrigeradora durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Antes de começar uma nova sessão, misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

C. Execução de calibração (apenas PCR)

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

- Descongele **VZV Q - PCR Standard** (Cal1: VZV Q-PCR Standards 10², Cal2: VZV Q-PCR Standards 10³, Cal3: VZV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: VZV Q-PCR Standards 10⁵) à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Descongele os tubos da **VZV Q-PCR Mix** necessários à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 24 reações em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Proteja a **VZV Q-PCR Mix** da luz enquanto a aquece, dado que este reagente é fotossensível.

- Retire os “**Racks**” de “Lane 1, 2 and 3” (L1, L2, L3) da “Cooler Unit” e coloque-os na mesa de preparação.
- Selecione o “Run mode: PCR Only”.
- Carregue os standards de calibração no “**Elution Rack**”.
- Insira o “**Elution Rack**” na “Cooler Unit”, começando a partir da “Lane 3” (L3) seguindo as instruções na GUI. Selecione “Next” para continuar.
- Se necessário, para cada “Position” introduza o “Reagent name” e o “S/N” (número de série), o “Lot No.” (número de lote), a “Exp. Date” (data de expiração) e o “T/R” (número de reações).
- Mesmo que não seja efetuada a extração, verifique o Volume de entrada de extração (200 µL) e o Volume de eluição extraído (100 µL).
- Selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna “Assay” (**VZV ELITe_Be_STD**). Clique no botão “Next” para continuar a preparação.
- Carregue a **VZV Q-PCR Mix** no “**Reagent/Elution Rack**”.
- Insira o “**Reagent/Elution Rack**” na “Cooler Unit”, na “Lane 2” (L2) seguindo as instruções na GUI. Selecione “Next” para continuar.
- Verifique as pontas nos “**Tip Racks**” na “Inventory Area” e substitua o suporte(s) de pontas, se necessário. Selecione “Next” para continuar.
- Carregue o “**PCR Basket**” com “**PCR Cassette**” na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Selecione “Next” para continuar.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione “Start” para iniciar a execução.

Quando a sessão é concluída, o **ELITe BeGenius** permite aos utilizadores 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 e outros consumíveis devem ser removidos do instrumento e eliminados sem produzir contaminações ambientais. Evite quaisquer derrames dos produtos de reação.

Nota: A Q-PCR Mix pode ser utilizada para 5 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada na unidade de refrigeração durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Antes de começar uma nova sessão, misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

D. Execução de amplificação para o positive control e o negative control (apenas PCR)

Para preparar o positive control e o negative control da execução de amplificação, realize os passos seguintes consultando a GUI:

1. Descongele o tubo de **VZV - ELite Positive Control** à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 4 reações. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Transfira pelo menos 50 µL da água de qualidade para biologia molecular (como Negative Control) para a sessão num tubo Eluição, fornecido com o **ELITE InGenius SP Consumable Set**.
3. Descongele os tubos da **VZV Q-PCR Mix** necessários à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 24 reações em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Proteja a **VZV Q - PCR Mix** da luz enquanto a aquece, dado que este reagente é fotossensível

4. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
5. Retire os "Racks" de "Lane 1, 2 and 3" (L1, L2, L3) da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
6. Selecione o "Run mode: PCR Only".
7. Carregue os tubos de Positive Control e Negative Control no "Elution Rack".
8. Insira o "Elution Rack" na "Cooler Unit", começando a partir da "Lane 3" (L3) seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar.
9. Se necessário, para cada "Position" introduza o "Reagent name" e o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).
10. Mesmo que não seja efetuada a extração, verifique o Volume de entrada de extração (200 µL) e o Volume de eluição extraído (100 µL).
11. Selecione o protocolo de ensaio a utilizar **VZV ELITE_Be_PC** e **VZV ELITE_Be_NC** na coluna "Assay". Selecione "Next" para continuar.
12. Carregue a **VZV Q-PCR Mix** no "Reagent/Elution Rack".
13. Insira o "Reagent/Elution Rack" na "Cooler Unit", na "Lane 2" (L2) seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar.
14. Verifique as pontas nos "Tip Racks" na "Inventory Area" e substitua o suporte(s) de pontas, se necessário. Selecione "Next" para continuar.
15. Carregue o "PCR Basket" com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
16. Feche a porta do instrumento.
17. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Quando a sessão é concluída, o **ELITE BeGenius** permite aos utilizadores 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. O restante negative control deve ser eliminado.

Nota: No final da execução, as PCR Cassettes e os outros consumíveis têm de ser eliminados seguindo todos os regulamentos governamentais e ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: A Q-PCR Mix pode ser utilizada para 5 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada na unidade de refrigeração durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Antes de começar uma nova sessão, misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Revisão e aprovação de resultados

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

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

O **ELITE BeGenius** gera os resultados utilizando o **VZV ELITE MGB Kit** através dos seguintes procedimentos:

- A. Validação da Curva de calibração,
- B. Validação dos resultados do Controlo Positivo e Controlo Negativo,
- C. Validação dos resultados da amostra,
- D. Elaboração do relatório do resultado da amostra.

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

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO
ELITE InGenius e ELITE BeGenius

Sensibilidade analítica: Limite de deteção (LdD)

A sensibilidade analítica deste ensaio, como Limite de deteção (LoD) da amplificação de ADN, permite detetar a presença de cerca de 10 cópias em 20 µL de ADN adicionado 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 de plasmídeo foi diluído a um título de cerca de 10 cópias/20 µL na presença de ADN de plasmídeo contendo o controlo interno a um título de 150.000 cópias/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.

Amostras	N	positivo	negativo
10 cópias de ADN de plasmídeo + 500 ng de ADN genómico humano	24	24	0

O Limite de deteção (LoD) do VZV ELITE MGB Kit foi verificado em associação com amostras de **Sangue total** e **Plasma** colhidas em EDTA e **LCR** e nos sistemas **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**.

Para Sangue Total:

O LdD deste ensaio foi verificado através de testes a 20 réplicas de amostras de sangue total reforçadas com 117 cópias/mL nos sistemas **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** no modo "Extract + PCR". As amostras foram reforçadas usando material de referência certificado de VZV (Acrometrix for Varicella Zoster Virus DNA (Ref. 954530)).

O LdD é confirmado se, pelo menos, 18 em 20 réplicas derem resultado positivo.

Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de deteção para amostras de sangue total e ELITE InGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
Sangue total colhido em EDTA	100 cópias/mL	20	20	20	0

Limite de deteção para amostras de sangue total e ELITE InGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
Sangue total colhido em EDTA	100 cópias/mL	20	20	20	0

O valor de LoD para o alvo de VZV foi confirmado a 100 IU/mL para sangue total colhido em EDTA.

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

REF RTS035PLD

Para Plasma:

O LdD deste ensaio foi verificado através de testes a 20 réplicas de amostras de plasma reforçadas com 69 cópias/mL nos sistemas **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** no modo "Extract + PCR". As amostras foram reforçadas usando material de referência certificado de VZV (Acrometrix for Varicella Zoster Virus DNA (Ref. 954530)).

O LdD é confirmado se, pelo menos, 18 em 20 réplicas derem resultado positivo. Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de detecção para amostras de plasma e ELITe InGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
Plasma colhido em EDTA	69 cópias/mL	20	20	20	0

Limite de detecção para amostras de plasma e ELITe BeGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
Plasma colhido em EDTA	69 cópias/mL	20	20	20	0

O valor de LoD para o alvo de VZV foi confirmado a 69 IU/mL para plasma colhido em EDTA.

Para o líquido cefalorraquidiano (LCR):

O LdD deste ensaio foi verificado através de testes a 20 réplicas de amostras de LCR reforçadas com 69 cópias/mL nos sistemas **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** no modo "Extract + PCR". As amostras foram reforçadas usando material de referência certificado de VZV (Zeptomatrix for Varicella Zoster Virus DNA (Ref. 954530)).

O LdD é confirmado se, pelo menos, 18 em 20 réplicas derem resultado positivo. Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de detecção para amostras de LCR e ELITe InGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
LCR	69 cópias/mL	20	20	19	1

Limite de detecção para amostras de LCR e ELITe BeGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
LCR	69 cópias/mL	20	20	20	0

O valor do LdD para o alvo VZV foi confirmado a 69 IU/mL para líquido cefalorraquidiano.

Intervalo de medição linear e Limites de quantificação

O intervalo de medição linear do VZV ELITe MGB Kit usado em associação com **Sangue total e Plasma** colhido em EDTA e **LCR** e os **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** foi verificado com um painel de diluições de VZV. O painel foi preparado por material de referência certificado de VZV (Acrometrix and Zeptomatrix for Varicella Zoster Virus DNA) em ADN de VZV - matrizes negativas.

Para Sangue Total:

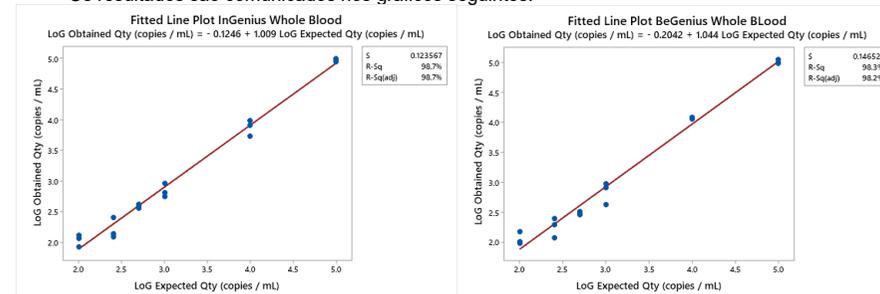
O painel era constituído por seis pontos de diluição a partir de 1×10^5 cópias/mL a 1×10^2 cópias/mL. Cada amostra do painel foi testada em 3 réplicas usando um painel preparado através do material de referência (Acrometrix for Varicella Zoster Virus DNA (Ref. 954530)).

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 (R²) igual a 0,987 para o **ELITe InGenius** e 0,983 para o **ELITe BeGenius**.

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

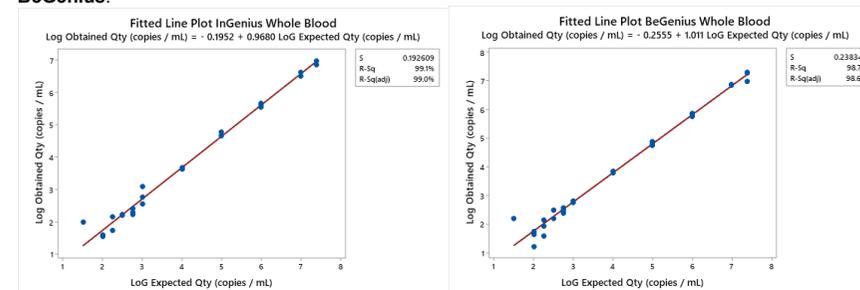
REF RTS035PLD

Os resultados são comunicados nos gráficos seguintes.



O intervalo de medição linear do VZV ELITe MGB Kit usado em associação com sangue total e o ELITe InGenius e ELITe BeGenius foram testados numa gama mais ampla de concentrações usando um painel preparado através da diluição de ADN de plasmídeo contendo produto de amplificação de VZV em ADN de VZV - matriz negativa. O painel é composto por dez pontos de diluição (passos de diluição de 1 Registo) de $2,5 \times 10^7$ a 100 cópias/mL para Sangue total. 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 (R²) igual a 0,991 para o **ELITe InGenius** e 0,987 para o **ELITe BeGenius**.



O Limite inferior de quantificação (LLoQ) foi definido à concentração do LoD que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,2215 Registo cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,3219 Registo cópias/mL para o **ELITe BeGenius**) e exatos (Bias igual a 0,1038 Registo cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,2149 Registo cópias/mL para o **ELITe BeGenius**): 100 cópias/mL.

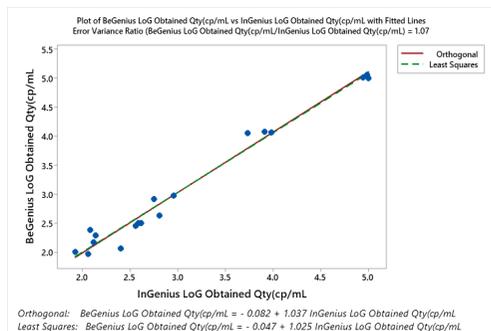
O Limite superior de quantificação (ULoQ) foi definido à concentração mais alta testada que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,0626 Registo cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,1790 Registo cópias/mL para o **ELITe BeGenius**) e exatos (Bias igual a 0,4509 Registo cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,2062 Registo 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
cópias/mL	100	25.000.000

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.



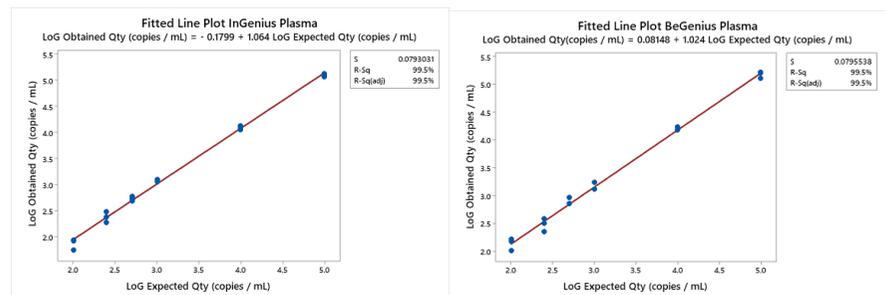
Neste teste, a análise da regressão ortogonal foi realizada e gerou uma interceção igual a -0,082 (95% CI: - 0,3286; 0,1652) e um declive igual a 1,037 (95% CI: 0,9608; 1,1126). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0,978.

Para Plasma:

O painel era constituído por seis pontos de diluição a partir de 1×10^5 cópias/mL a 1×10^2 cópias/mL. Cada amostra do painel foi testada em 3 réplicas usando um painel preparado através do material de referência (Acrometrix for Varicella Zoster Virus DNA (Ref. 954530)).

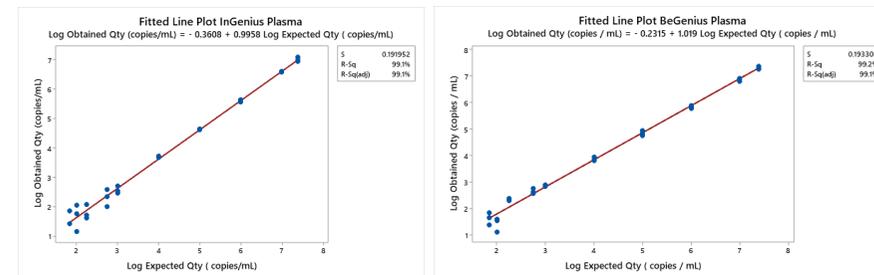
A análise dos dados obtidos, realizada por análise da regressão linear, demonstrou que o ensaio, em associação com amostras de sangue total, mostra uma resposta linear para todas as diluições com um coeficiente de correlação quadrado (R2) igual a 0,995 para o **ELITe InGenius** e 0,995 para o **ELITe BeGenius**.

Os resultados são comunicados nos gráficos seguintes.



O intervalo de medição linear do VZV ELITe MGB Kit usado em associação com plasma e o ELITe InGenius e ELITe BeGenius foram testados numa gama mais ampla de concentrações usando um painel preparado através da diluição de ADN de plasmídeo contendo produto de amplificação de VZV em ADN de VZV - matriz negativa. O painel é composto por dez pontos de diluição (passos de diluição de 1 Registo) de $2,5 \times 10^7$ a 69 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 (R2) igual a 0,991 para o **ELITe InGenius** e 0,992 para o **ELITe BeGenius**.



O Limite inferior de quantificação (LLoQ) foi definido à concentração do LoD que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,2005 Registo cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,2048 Registo cópias/mL para o **ELITe BeGenius**) e exatos (Bias igual a 0,1384 Registo cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,2513 Registo cópias/mL para o **ELITe BeGenius**): 69 cópias/mL.

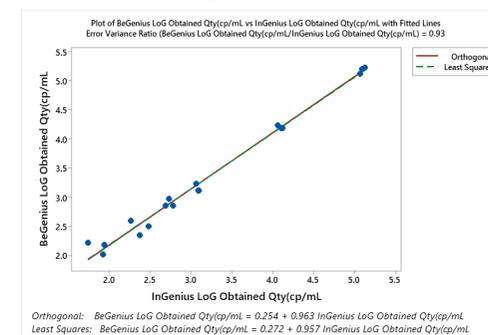
O Limite superior de quantificação (ULoQ) foi definido à concentração mais alta testada que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,0831 Registo cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,0444 Registo cópias/mL para o **ELITe BeGenius**) e exatos (Bias igual a 0,3828 Registo cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,0775 Registo 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
cópias/mL	69	25.000.000

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, foi realizada uma análise de Regressão Ortogonal e foi gerada uma interceção equivalente a 0,254 (95% CI:0,082; 0,425) e um declive igual a 0,963 (95% CI: 0,912; 1,013). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0,989.

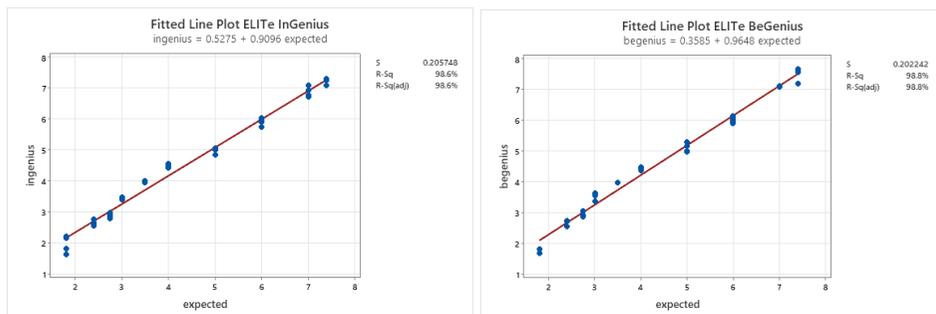
Para o líquido cefalorraquidiano (LCR):

O painel era constituído por dez pontos de diluição de $2,5 \times 10^7$ a 69 cópias/mL. Cada amostra do painel foi testada em 4 réplicas usando um painel preparado através do material de referência (Zeptomatrix, Varicella Zooster Varicella Zoster Virus (VZV) Strain: Ellen Culture Fluid (1 mL), (0810171CF)).

A análise dos dados obtidos, realizada por análise da regressão linear, demonstrou que o ensaio, em associação com amostras de LCR, demonstra uma resposta linear para todas as diluições com um

coeficiente de correlação quadrado (R2) igual a 0,986 para o **ELITe InGenius** e 0,988 para o **ELITe BeGenius**.

Os resultados são comunicados nos gráficos seguintes.



O Limite inferior de quantificação (LLoQ) foi definido à concentração do LoD que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,2816 Registo cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,0787 Registo cópias/mL para o **ELITe BeGenius**) e exatos (Bias igual a 0,1127 Registo cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,0902 Registo cópias/mL para o **ELITe BeGenius**): 69 cópias/mL.

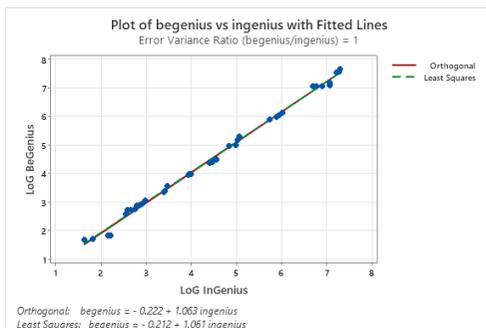
O Limite superior de quantificação (ULoQ) foi definido à concentração mais alta testada que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,1005 Registo cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,2102 Registo cópias/mL para o **ELITe BeGenius**) e exatos (Bias igual a 0,1803 Registo cópias/mL para o **ELITe InGenius** e 0,0936 Registo 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
cópias/mL	69	25.000.000

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 foi realizada e gerou uma interceção igual a -0,222 (95% CI: -0,3241; -0,1196) e um declive igual a 1,063 (1,0418; 1,0847). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0,996.

Repetibilidade

A Repetibilidade dos resultados obtidos pelo produto VZV 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 VZV (Acrometrix for Varicella Zoster Virus DNA (Ref. 954530)) a uma concentração de 3 x LoD (cerca de 300 cópias/mL) e de 10 x LoD (cerca de 1000 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	VZV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	23,76	0,38	1,58
3 x LoD	8 / 8	36,53	0,21	0,57				
10 x LoD	8 / 8	34,78	0,21	0,61				

Repetibilidade inter-sessão ELITe InGenius								
Amostra	VZV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	48 / 48	23,85	0,48	2,01
3 x LoD	16 / 16	36,67	0,43	1,17				
10 x LoD	16 / 16	34,77	0,32	0,91				

No teste de Repetibilidade no **ELITe InGenius**, o ensaio detetou o alvo VZV como esperado e mostrou valores de Ct com %CV abaixo de 5% para VZV 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	VZV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	27,33	0,60	2,21
3 x LoD	8 / 8	37,49	0,74	1,97				
10 x LoD	8 / 8	35,38	0,35	0,98				

Repetibilidade inter-sessão ELITe BeGenius								
Amostra	VZV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	48 / 48	26,67	0,60	2,25
3 x LoD	16 / 16	37,32	0,69	1,84				
10 x LoD	16 / 16	35,39	0,31	0,87				

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

REF RTS035PLD

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

Reprodutibilidade

A Capacidade de reprodução dos resultados obtidos pelo produto VZV 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 VZV (Acrometrix for Varicella Zoster Virus DNA (Ref. 954530)) a uma concentração de 3 x LoD (cerca de 300 cópias/mL) e de 10 x LoD (cerca de 1000 cópias/mL).

A Capacidade de reprodução inter-instrumento no **ELITe InGenius** foi obtida através da análise de amostras do painel em oito réplicas, em uma execução por dia, em dois dias, usando o mesmo lote e 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 Capacidade de reprodução inter-lote no **ELITe InGenius** foi obtida através da análise de amostras do painel em oito réplicas, em duas execuções por dia, com dois lotes diferentes e no mesmo instrumento pelo mesmo operador. As amostras foram processadas em posições aleatórias no sistema **ELITe InGenius** no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

Os valores de 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.

Capacidade de reprodução inter-instrumento ELITe InGenius								
Amostra	VZV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	22,76	0,61	2,69
3 x LoD	8 / 8	36,47	0,32	0,86				
10 x LoD	8 / 8	34,87	0,34	0,99				

Capacidade de repetição inter-lote ELITe InGenius								
Amostra	VZV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	23,07	0,58	2,54
3 x LoD	8 / 8	36,78	0,27	0,75				
10 x LoD	8 / 8	35,06	0,31	0,88				

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

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

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

Os valores de 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.

Capacidade de repetição inter-instrumento ELITe BeGenius								
Amostra	VZV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	26,22	0,67	2,55
3 x LoD	8 / 8	37,05	0,47	1,26				
10 x LoD	8 / 8	35,18	0,43	1,21				

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

REF RTS035PLD

Capacidade de repetição inter-lote ELITe BeGenius								
Amostra	VZV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	26,43	0,99	3,73
3 x LoD	8 / 8	37,11	0,45	1,21				
10 x LoD	8 / 8	35,05	0,36	1,03				

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

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 calibrado VZV Molecular "Q" Panel (Qnostics, Ltd). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção 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 Log ₁₀ cópias/mL	Positivo/réplicas	Resultados médios Log ₁₀ cópias / mL
VZVMQP01-Alto	10 ⁵	5,000	2/2	5,138
VZVMQP01-Médio	10 ⁴	4,000	2/2	4,312
VZVMQP01-Baixo	10 ³	3,000	2/2	3,340
VZVMQP01-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 QCMD 2014 Varicella Zoster Virus DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, Reino Unido) um painel de diluições VZV dentro da concentração limite. Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção 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 conc. Registo ₁₀ cópias/mL	Desvio padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios Log ₁₀ cópias / mL
VZVDNA14-01	3,267	0,438	2/2	3,674
VZVDNA14-02	3,339	0,520	2/2	3,713
VZVDNA14-03	2,465	0,491	2/2	2,768
VZVDNA14-04	Negativo	N.A.	0/2	Não detetado
VZVDNA14-05	2,716	0,377	2/2	3,317
VZVDNA14-06	1,980	0,411	1/2	1,994
VZVDNA14-07	Negativo	N.A.	0/2	Não detetado
VZVDNA14-08	3,475	0,678	2/2	3,870
VZVDNA14-09	3,918	0,653	2/2	4,306
VZVDNA14-10	2,071	0,428	2/2	1,949

Todas as amostras negativas foram corretamente detetadas como negativas e todas as amostras positivas foram corretamente detetadas como positivas em conformidade com os resultados quantitativos definidos pelo consenso EQA. A amostra VZV DNA14-06 devolveu apenas um resultado positivo em 2 réplicas. Isto pode explicar-se pelo facto de o título de amostra estar abaixo do limite de detecção. Sete amostras foram quantificadas dentro do intervalo definido pelo Consenso do estudo ± 1 desvio padrão (PD), uma amostra foi quantificada dentro do intervalo definido pelo Consenso do estudo ± 2 PD.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

Sangue total e plasma

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada através da análise de algumas amostras clínicas de sangue total colhido em EDTA e plasma colhido em EDTA positivas para ADN de VZV em associação com o ELITe InGenius. Dado que o **ELITe BeGenius** tem desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITe InGenius**, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a sensibilidade do diagnóstico do ensaio obtido em associação com o **ELITe InGenius** também se aplica ao **ELITe BeGenius**.

Foi avaliada a sensibilidade diagnóstica usando 28 amostras de sangue total colhido em EDTA negativo para ADN de VZV, que foram reforçadas para ADN de VZV adicionando amostra VZV07-04, de "QCMD 2007 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel"(Qnostics Ltd, RU) a um título de 750 cópias/mL; 30 amostras de plasma colhidas em EDTA negativas para ADN de VZV que foram reforçadas com ADN de HSV2 adicionando "VZV ELITe-IQC High Run Control" (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, detecção 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 VZV	28	27	1
Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de VZV	30	30	0

Todas as amostras de plasma foram válidas e positivas.

Neste teste, a sensibilidade de diagnóstico do ensaio em associação com amostras de sangue foi igual a 100%.

Todas as amostras de sangue total foram válidas e 27 de 28 amostras foram confirmadas como positivas. Uma amostra de sangue total testou negativa, esta amostra discrepante deixou de estar disponível para análise da discrepância.

Neste teste, a sensibilidade de diagnóstico do ensaio em associação com amostras de sangue foi igual a 96,4%.

Líquido cefalorraquidiano

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada através da análise de algumas amostras clínicas de líquido cefalorraquidiano positivas para ADN de VZV em associação com o **ELITe InGenius**. Dado que o **ELITe BeGenius** tem desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITe InGenius**, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a sensibilidade do diagnóstico do ensaio obtido em associação com o **ELITe InGenius** também se aplica ao **ELITe BeGenius**.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada usando 20 amostras de líquido cefalorraquidiano negativas para ADN de VZV, que foram reforçadas para ADN de VZV adicionando "VZV ELITe-IQC High Run Control" (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, detecção 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
Líquido cefalorraquidiano reforçado para ADN de VZV	20	20	0

Todas as amostras de líquido cefalorraquidiano foram válidas e positivas.

Neste teste, a sensibilidade de diagnóstico do ensaio foi igual a 100%.

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

Sangue total e plasma

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi avaliada através da análise de algumas amostras clínicas de sangue total colhido em EDTA e plasma colhido em EDTA negativas para ADN de VZV em associação com o ELITe InGenius. Dado que o **ELITe BeGenius** tem desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITe InGenius**, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a sensibilidade do diagnóstico do ensaio obtido em associação com o **ELITe InGenius** também se aplica ao **ELITe BeGenius**.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 34 amostras de sangue total colhidas em EDTA a partir de doadores saudáveis que estavam presumivelmente negativos para ADN de VZV e 30 amostras de plasma colhidas em EDTA a partir de doadores saudáveis que estavam presumivelmente negativos para ADN de VZV.

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

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA negativo para ADN de VZV	34	0	34
Plasma colhido em EDTA negativo para ADN de VZV	30	0	30

Todas as amostras de sangue total e plasma foram válidas e negativas.

Neste teste, a especificidade de diagnóstico do ensaio foi igual a 100% para ambas as matrizes.

Líquido cefalorraquidiano

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi avaliada através da análise de algumas amostras clínicas de líquido cefalorraquidiano negativas para ADN de VZV em associação com o **ELITe InGenius**. Dado que o **ELITe BeGenius** tem desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITe InGenius**, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a especificidade do diagnóstico do ensaio obtido em associação com o **ELITe InGenius** também se aplica ao **ELITe BeGenius**.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 22 amostras de líquido cefalorraquidiano de doadores saudáveis que estavam presumivelmente negativos para ADN de VZV.

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

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Líquido cefalorraquidiano negativo para ADN de VZV	22	0	22

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

O valor-limite da Ct do controlo interno (Ct CI) está definido para 35 para cada matriz validada.

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 líquido cefalorraquidiano com o **ELITe STAR** e com o **software versão 3.4.13** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **UUNI_E100S200_ELI**, que utiliza 200 µL de amostra e elui o extrato em 100 µL (a eluição é feita normalmente em 115 µL, dos quais 100 µL são recuperados). As amostras nos tubos primários podem ser carregadas diretamente no **ELITe STAR**. É sempre necessário um volume mínimo de 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 **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 210 µL ou 200 µL (a eluição é feita normalmente em 210 µL, dos quais 200 µL são recuperados). As amostras nos tubos primários podem ser carregadas diretamente no **ELITe GALAXY**. É sempre necessário um volume mínimo de 400-650 µL, dependendo da classe do tubo usado, para cada amostra. Adicione **10 µL/amostra** de **CPE**. O CPE deve ser adicionado à **solução de CI + Carrier** como indicado no manual do kit de extração. Para o procedimento de extração, consulte o manual de instruções de utilização do kit de extração.

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de amostras 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, carregue a tira no instrumento 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** ao conteúdo da tira pela pipeta de vários canais, utilizando o programa número 3; em seguida, prossiga com a extração. Elua o ADN em **100 µL** de tampão de eluição.

Sangue total colhido em EDTA

As amostras de sangue total 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 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 (amostra celular) através do kit **EXTRAblood**, siga o manual de instruções de funcionamento: comece com **200 µL** da amostra (máximo de 2 milhões de células), recupere o ADN em **100 µL** de tampão de eluição.

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_ELI**, que utiliza 200 µL de amostra e elui o extrato em 100 µL. As amostras nos tubos primários podem ser carregadas diretamente no **ELITe STAR**. É sempre necessário um volume mínimo de 700 µL para cada amostra. Adicione **200 µL** de **CPE** ao tubo Proteinase-Carrier como indicado no manual

do kit de extração. Para o procedimento de extração, consulte o manual de instruções de utilização do kit de extração.

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

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 de plasma com o **ELITe STAR** e com **software versão 3.4.13** (ou versões mais recentes equivalentes), utilize o protocolo de extração **UUNI_E100S200_ELI**, que utiliza 200 µL de amostra e elui o extrato em 100 µL. As amostras nos tubos primários podem ser carregadas diretamente no **ELITe STAR**. É sempre necessário um volume mínimo de 700 µL para cada amostra. Adicione **200 µL** de **CPE** ao tubo Proteinase-Carrier como indicado no manual do kit de extração. Para o procedimento de extração, consulte o manual de instruções de utilização do kit de extração.

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de 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 do 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 furos, adicione **5 µL** de **CPE** para o controlo interno antes de adicionar a **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica**. Elua o ADN 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: zaragatoas de lesões mucocutâneas, 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.

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, 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 positivo control, utilize o produto **VZV - ELITe Positive Control** ou o produto **VZV - ELITe Positive Control**.

Controlos da qualidade

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

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 VZV com o "dispositivo de relatório" = "FAM" e o "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) " e dar-lhe o nome "VZV";
- 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	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵							

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

Com consulta da documentação do instrumento, definida no software dedicado (Instrumento > Protocolo de ciclo térmico > Perfil térmico) os parâmetros do **ciclo térmico**:
- adicione à fase de amplificação o passo (Adicionar passo) de **extensão a 72 °C**;

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

- modifique o tempo como indicado na 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 VZV com o "dispositivo de relatório" = "FAM" e o "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) " e dar-lhe o nome "VZV";
- 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**;
- 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 detecção (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 necessário:

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

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

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

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

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

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

- quando for necessário um resultado **qualitativo** da análise (detecção de ADN de VZV): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **VZV - Positive Control** no furo correspondente na **Amplification microplate**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o controlo positivo introduzindo com a pipeta o **VZV - Controlo positivo** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.

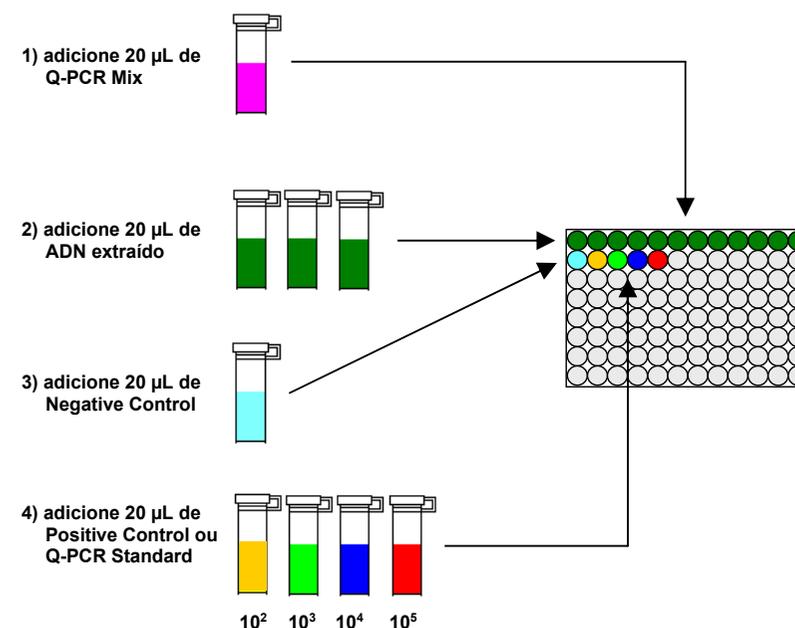
- Quando for necessário um resultado **quantitativo** da análise (quantificação de ADN de VZV): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **VZV Q - PCR Standard 10²** no furo correspondente na **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o padrão introduzindo com a pipeta o **VZV Q - PCR**

Standard 10² três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma com os **VZV Q - PCR Standards 10³, 10⁴, 10⁵**.

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

Nota: No final do ciclo térmico a **microplaca da amplificação** 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.

Análise qualitativa dos resultados

Os valores registados da fluorescência emitida pela sonda específica do VZV (detetor FAM "VZV") 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 VZV, a fluorescência FAM da sonda específica do VZV 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 "VZV" 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 "VZV" para **0,2**;
- defina manualmente o **Limiar** para o detetor VIC "CI" para **0,1**.

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

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

Detetor de reação de controlo positivo FAM "VZV"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETO

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

***Nota:** Quando este produto for usado para a quantificação de ADN de VZV, foram preparadas as reações de **Q - PCR Standard** em vez da reação de **Controlo positivo**. Neste caso, valide a amplificação e a deteção através da referência à reação de amplificação de **Q - PCR Standard 10⁵ (Ct ≤ 25)**.

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

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

Se o resultado da reação de amplificação **Controlo negativo** for diferente de **Ct não determinado** para VZV, 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 VZV é usado para determinar o ADN alvo, enquanto o valor de **Ct** do Controlo Interno é usado para validar a extração, amplificação e deteção.

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

Este produto é capaz de detetar uma quantidade mínima de cerca de 10 cópias de ADN do gene da proteína de ligação ao ADN principal (ORF29) do VZV na reação de amplificação, que corresponde aos Equivalentes do genoma por reação (limite de deteção para o produto, consulte o parágrafo Características de desempenho).

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

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

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct não determinado** para o VZV e **Ct > 35** ou **Ct não determinado** para o Controlo interno, significa que foi impossível detetar eficientemente o ADN para o Controlo interno. Neste caso, ocorreram problemas durante o passo de amplificação (amplificação ineficiente ou ausente) ou durante o passo de extração (degradação da amostra de ADN, a amostra com número insuficiente de células, perda de ADN durante a extração ou presença de inibidores) que podem causar resultados incorretos e falsos negativos. A amostra não é adequada, o ensaio é inválido e precisa ser repetido, começando pela extração de uma nova amostra.

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct não determinado** para o VZV e **Ct ≤ 35** para o Controlo Interno, significa que o ADN do VZV não é detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode excluir-se o facto de o ADN do VZV 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 VZV é detetado na reação de amplificação de uma amostra, o Controlo Interno pode resultar em **Ct > 35** ou **Ct não determinado**. Na realidade, a reação de amplificação de baixa eficiência para o Controlo Interno pode ser deslocada por concorrência com a reação de amplificação de elevada eficiência para o ADN do VZV. 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 VZV são usados para calcular a **Curva Standard** (Resultados > Curva Standard) para a sessão de amplificação e para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

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

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 VZV na reação de amplificação de cada **amostra** e a **Curva standard** (Resultados > 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 da proteína de ligação ao ADN principal (ORF29) do VZV na reação de amplificação, que corresponde aos Equivalentes do genoma por reação (intervalo de medição linear do produto, consulte Características de desempenho), tal como descrito na tabela seguinte:

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

Os resultados (**Quantidade**) de cada **amostra** (Resultados > Relatório) são usados para calcular os equivalentes do genoma (**gEq**) do VZV 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 expressa de acordo com a unidade de medição exigida;

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

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

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

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

Quando é usado o kit de extração **EXTRAblood** com amostras de sangue 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 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 sistema de extração **NucliSENS® easyMAG®** com amostras de líquido cefalorraquidiano ou plasma colhido em EDTA e é necessário o resultado **expresso em gEq/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

Quando é usado um método de extração em particular, os limites do intervalo de medição linear, como gEq/mL da amostra, podem ser calculados a partir do intervalo de medição linear da reação de amplificação de acordo com esta 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 **EXTRAblood** com amostras de sangue total colhido em EDTA, a fórmula passa a ser:

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

Quando é usado o sistema de extração **ELITe STAR** com amostras 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:

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

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:

$$\begin{aligned} \text{Limites do intervalo de medição (gEq/mL) com NucliSENS® easyMAG®} \\ \text{Limite inferior (gEq/mL)} &= 10 \times 10 \text{ gEq} \\ \text{Limite superior (gEq/mL)} &= 10 \times 1.000.000 \text{ gEq} \\ &\text{de 100 a 10.000.000 gEq/mL} \end{aligned}$$

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

REF RTS035PLD

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 nos 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A sensibilidade analítica do ensaio, como limite de deteção, foi testado usando o ADN plasmídico 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 50 réplicas a realizarem a amplificação por produtos ELITechGroup S.p.A..

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

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

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de sangue total e o ELITe GALAXY foi verificada com um painel de diluições de VZV dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da VZV07-12 do "QCMD 2007 Varicella Zoster Virus DNA EQA Panel" (Qnostic Ltd, RU) em ADN de VZV - sangue total EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 10 gEq/mL a 562 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
95% de positividade	100 gEq/mL	64 gEq/mL	241 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 VZV dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição da VZV07-12 do "QCMD 2007 Varicella Zoster Virus DNA EQA Panel" (Qnostic Ltd., RU) em ADN de VZV - plasma em EDTA negativo. As concentrações virais variaram de 10 gEq/mL a 562 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 plasma e ELITe GALAXY (gEq/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	69 gEq/mL	46 gEq/mL	164 gEq/mL

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

REF RTS035PLD

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

A análise dos dados obtidos, realizada por regressão linear, demonstrou que o ensaio mostra uma resposta linear para todas as diluições (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 genoma Equivalentes 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 genoma Equivalentes 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 de amplificação, permitiu a aquisição de uma percentagem média do Coeficiente de variação (% CV) de cerca de 21,0% das quantidades medidas, dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas nos 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A precisão do ensaio, enquanto diferença entre a média dos resultados obtidos com várias réplicas de uma amostra dentro da mesma sessão de amplificação e o valor de concentração teórica da amostra, permitiu a aquisição de uma percentagem média de Imprecisão (% Imprec.) de cerca de 9,7% das quantidades medidas, dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas nos 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

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

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

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

Os testes foram realizados utilizando como material de referência calibrado e certificado um painel de diluições de VZV, estirpes 98/4 e Ellen, dentro da concentração limite ("QCMD 2010 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel", Qnostics Ltd, RU). Cada amostra do painel foi ressuspensa em sangue total em EDTA e usada em duplicado através da realização de toda a análise, extração com EXTRAblood e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com material de referência certificado e EXTRAblood				
Amostra	Consenso dos ensaios comerciais Log ₁₀ Conc. do vírus	Desvio Padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios Log ₁₀ gEq / mL
VZV10-01	2,047	0,593	2/2	1,748
VZV10-02	negativo	N/A	0/2	Não detetado
VZV10-03	1,844	1,140	2/2	1,569
VZV10-04	1,489	0,378	1/2	1,439
VZV10-05	HSV1	N/A	0/2	Não detetado
VZV10-06	2,428	0,471	2/2	2,274
VZV10-07	2,149	0,648	2/2	2,070
VZV10-08	3,410	0,454	2/2	3,618
VZV10-09	0,964	0,729	1/2	1,687
VZV10-10	3,174	0,454	2/2	3,136

Todas as amostras foram detetadas corretamente. As amostras de VZV10-04 (31 cópias/mL) e VZV10-09 (9 cópias/mL) apresentaram apenas um resultado positivo em 2 réplicas, mas em concentrações inferiores ao limite de deteção do produto. Todos os resultados quantitativos obtidos estão dentro do intervalo definido pelo Desvio padrão ± 1 do consenso.

Os testes adicionais foram realizados utilizando como material de referência calibrado um painel de diluições de VZV, estirpes 98/4 e Ellen, dentro da concentração limite ("QCMD 2012 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel", Qnostics Ltd, RU). Cada amostra do painel foi testada em duplicado através da realização de todo o procedimento: extração com o **ELITe STAR** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência certificados e o ELITe STAR				
Amostra	Consenso dos ensaios comerciais Log ₁₀ Conc. do vírus	Desvio Padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios Log ₁₀ gEq / mL
VZV12-01	negativo	N/A	0/2	Não detetado
VZV12-02	3,150	0,439	2/2	3,535
VZV12-03	4,052	0,588	2/2	4,564
VZV12-04	2,280	0,584	2/2	2,267
VZV12-05	2,547	0,450	2/2	2,854
VZV12-06	3,099	0,406	2/2	3,349
VZV12-07	2,794	0,633	2/2	3,129
VZV12-08	1,926	0,418	2/2	1,697
VZV12-09	2,287	0,561	2/2	2,531
VZV12-10	negativo	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 quantitativos definidos pelo consenso dos ensaios comerciais.

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

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o ELITe GALAXY				
Amostra	Consenso dos ensaios comerciais Log ₁₀ Conc. do vírus	Desvio Padrão	Positivo/réplicas	Resultados médios Log ₁₀ gEq / mL
VZV12-01	negativo	N/A	0/2	Não detetado
VZV12-02	3,150	0,439	2/2	3,061
VZV12-03	4,052	0,588	2/2	4,275
VZV12-04	2,280	0,584	2/2	2,435
VZV12-05	2,547	0,450	2/2	2,686
VZV12-06	3,099	0,406	2/2	3,359
VZV12-07	2,794	0,633	2/2	3,027
VZV12-08	1,926	0,418	1/2	1,860
VZV12-09	2,287	0,561	2/2	1,957
VZV12-10	negativo	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 quantitativos definidos pelo consenso dos ensaios comerciais. A amostra de VZV12-08 apresentou apenas um resultado positivo em 2 réplicas, tal pode ser explicado pelo facto de o título da amostra estar muito próximo do limite de deteção. Todos os resultados quantitativos obtidos estão dentro do intervalo definido pelo Desvio padrão ± 1 do consenso.

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

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como eficiência de deteção 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 primários e da sonda fluorescente no alinhamento das sequências disponíveis na base de dados para o gene da proteína de ligação ao ADN principal (ORF 29) do VZV revelou a respetiva conservação e ausência de mutações significativas.

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como eficiência de deteção e quantificação em diferentes genótipos/subtipos foi verificada testando um painel de materiais de referência certificados.

A sensibilidade diagnóstica foi verificada utilizando como material de referência calibrado e certificado um painel incluindo amostras positivas de ADN de VZV das estirpes 98/4 e Ellen ("QCMD 2010 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel", Qnostics Ltd, RU). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação por produtos ELITechGroup S.p.A.

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

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 sangue total colhidas em EDTA, com teste positivo para ADN de VZV.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 24 amostras de sangue total colhido em EDTA de doadores que estavam presumivelmente negativos para ADN de VZV ("Biological Sample Library Europe S.A.S.", Lyon, France) reforçadas num título conhecido para ADN de VZV adicionando amostra de VZV03-10 de "QCMD 2010 Human Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel" (Qnostics Ltd, UK). Cada amostra 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
Sangue total colhido em EDTA reforçado para ADN de VZV	24	24	0

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

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

A sensibilidade diagnóstica foi avaliada usando 22 amostras de líquido cefalorraquidiano negativo para ADN de VZV, que foram reforçadas para ADN de VZV adicionando amostra de VZV12-03, do "QCMD 2012 Varicella-Zoster virus EQA Panel" (Qnostics Ltd, UK), 30 amostras de sangue total colhido em EDTA negativo para ADN de VZV e 30 amostras de plasma colhidas em EDTA negativas para ADN de VZV, que foram reforçadas para ADN de VZV adicionando amostra de VZV07-06 "QCMD 2007 Human Varicella-Zoster Virus EQA Panel" (Qnostics Ltd, RU). Cada amostra foi usada para realização de todo o procedimento de análise: extração com **ELITe STAR** e a amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

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

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

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

A sensibilidade diagnóstica foi avaliada usando 20 amostras de líquido cefalorraquidiano negativo para ADN de VZV, que foram reforçadas para ADN de VZV adicionando amostra de VZV12-03, de "QCMD 2012 Varicella-Zoster virus EQA Panel" (Qnostics Ltd, RU), 30 amostras de plasma colhidas em EDTA negativas para ADN de VZV, que foram reforçadas para ADN de VZV adicionando amostra de VZV07-06, de "QCMD 2007 Human Varicella-Zoster Virus EQA Panel" (Qnostics Ltd, UK) e 30 amostras de sangue total colhidas em EDTA negativas para ADN de VZV, que foram reforçadas para ADN de VZV adicionando amostra de VZV07-06, de "QCMD 2007 Human Varicella-Zoster Virus EQA Panel" (Qnostics Ltd, UK). Cada amostra foi usada para a realização de todo o procedimento de análise: extração e Configuração PCR com o **ELITe GALAXY** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Líquido cefalorraquidiano reforçado para ADN de VZV	20	20	0
Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de VZV	30	29	0
Sangue total colhido em EDTA reforçado para ADN de VZV	30	29	0

Uma amostra de plasma e uma amostra de sangue total apresentaram um resultado inválido, devido a um erro no passo de extração, e não foram usadas para calcular a sensibilidade.

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

Especificidade analítica: ausência de reatividade cruzada com marcadores potencialmente interferentes

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

A análise do alinhamento das sequências dos primários e da sonda fluorescente com as sequências disponíveis nas bases de dados para organismos diferentes do VZV, incluindo os genomas completos de HSV1 e VZV, os vírus herpéticos humanos que mais semelhantes ao VZV, 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 a um painel de material de referência certificado.

A especificidade analítica foi verificada utilizando como material de referência calibrado e certificado um painel de diluições de HSV1 e VZV, dentro da concentração limite ("QCMD 2009 Herpes Simplex virus DNA EQA Panel", Qnostics Ltd, RU). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração com **EXTRAblood** e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Testes com material de referência certificado e EXTRAblood				
Amostra	Conteúdo	Consenso dos ensaios comerciais Log ₁₀ Conc. do vírus	Positivo/réplicas	Resultados médios Log ₁₀ gEq / mL
HSV09-01	HSV1	2,215	0/2	Não detetado
HSV09-02	HSV2	2,236	0/2	Não detetado
HSV09-03	HSV2	3,293	0/2	Não detetado
HSV09-04	HSV2	2,314	0/2	Não detetado
HSV09-05	VZV	-	2/2	4,939
HSV09-06	HSV1	2,402	0/2	Não detetado
HSV09-07	HSV1	4,189	0/2	Não detetado
HSV09-08	HSV2	2,389	0/2	Não detetado
HSV09-09	negativo	-	0/2	Não detetado
HSV09-10	HSV1	3,205	0/2	Não detetado

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

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas negativas, foi testada com recurso a algumas amostras clínicas de sangue total colhidas em EDTA, de doadores presumivelmente negativos para ADN de VZV.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 24 amostras de sangue total colhido em EDTA de doadores que estavam presumivelmente negativos para ADN de VZV ("Biological Sample Library Europe S.A.S.", Lyon, France). Cada amostra 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
Sangue total colhido em EDTA presumivelmente negativo para ADN de VZV	24	1	23

Uma amostra de sangue total de um dador apresentou resultado positivo para ADN de VZV com um título muito baixo (cerca de 17 qEq/mL) de produtos da ELITechGroup S.p.A.. A mesma amostra apresentou-se negativa, válida na segunda sessão de amplificação. A discordância pode ser explicada por uma reativação do VZV, um vírus amplamente disseminado na população, em relação a um período de latência. A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 95,8%.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 24 amostras de líquido cefalorraquidiano negativas para VZV de HSV2, 30 amostras de sangue total colhido em EDTA negativas para ADN de VZV (testadas com produto um CE IVD de amplificação em tempo real) e 30 amostras plasma colhido em EDTA negativas para ADN de VZV (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 VZV	24	0	24
Sangue total colhido em EDTA negativo para ADN de VZV	30	0	29
Plasma colhido em EDTA negativo para ADN de VZV	30	0	30

Uma amostra de sangue total apresentou um resultado inválido, possivelmente pela presença de um inibidor e não foi usada no cálculo da especificidade.

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

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 22 amostras de líquido cefalorraquidiano negativas para ADN de VZV, 34 amostras de plasma colhido em EDTA negativas para ADN de VZV e 35 amostras de sangue total colhido em EDTA negativas para ADN de VZV (testadas com um produto de

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

REF RTS035PLD

amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi usada para a realização de todo o procedimento de análise: extração e Configuração PCR com o **ELITE GALAXY** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Líquido cefalorraquidiano negativo para ADN de VZV	22	0	22
Plasma colhido em EDTA negativo para ADN de VZV	34	0	34
Sangue total colhido em EDTA negativo para ADN de VZV	35	0	35

Todas as amostras negativas foram corretamente detetadas como negativas para ADN de VZV. 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: Zaragatoas de líquido cefalorraquidiano (LCR) de lesões mucocutâneas, líquido amniótico.

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

REF RTS035PLD

Substâncias interferentes

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

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

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

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 **VZV - ELITe Positive Control** ou, em alternativa, o produto **VZV - ELITe Positive Control RF** ou o produto **VZV ELITe Standard**.

Controlos da qualidade

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

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.
Dissociação (opcional)	95°C	15 seg.
	40°C	30 seg.
	80°C	15 seg.

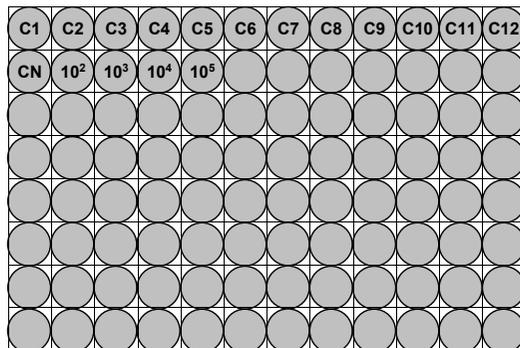
Nota: a aquisição de fluorescência ocorre individualmente, defina a Taxa Ramp (°C/seg.) para 4,4 °C/seg.

- seleccione os canais de deteção do sinal: "detetor" para a sonda de VZV com "FAM 465-510 de canal" e "detetor" para a sonda de controlo interno CI com "VIC 540-580 de canal";

Preencha o **Plano de trabalho** anexado no final deste Manual do utilizador, transcrevendo esta informação ou imprimindo a disposição da microplaca. O **Plano de trabalho** deve ser atentamente seguido aquando 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** (10^5 gEq, 10^4 gEq, 10^3 gEq, 10^2 gEq) para obter a **Curva standard**.

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



Legenda: C1 - C12: Amostras a serem analisadas; NC: Controlo de amplificação negativo; 10^2 : 10^2 gEq standard; 10^3 : 10^3 gEq standard; 10^4 : 10^4 gEq standard; 10^5 : 10^5 gEq standard.

Preparação da amplificação

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

Antes de iniciar a sessão, é necessário:

- recuperar e descongelar os tubos de teste que contêm as amostras a serem analisadas. Agite suavemente os tubos e depois coloque-os na centrifugadora durante 5 segundos para enviar o conteúdo para o fundo; em seguida, mantenha em gelo;
- recuperar e descongelar os tubos de teste que contêm a **Mistura VZV Q - PCR** necessária para a sessão, sem esquecer que o conteúdo de cada tubo é suficiente para realizar **25 reações**. Agite suavemente os tubos e depois coloque-os na centrifugadora durante 5 segundos para enviar o conteúdo para o fundo; em seguida, mantenha em gelo;
- recuperar e descongelar o tubo de teste que contêm o **VZV - Positive Control** ou, em alternativa, o **VZV - ELITe Positive Control RF** ou o tubo de teste contendo **VZV Q - PCR Standard**. Agite suavemente os tubos e depois coloque-os na centrifugadora durante 5 segundos para enviar o conteúdo para o fundo; em seguida, mantenha em gelo;
- recuperar a **Placa AD** a ser utilizada na sessão, certificando-se de que usa luvas sem poeiras para a manusear e que não danifica os furos.

1. Sem criar quaisquer bolhas e depositando exatamente no fundo, transfira **20 µL** da mistura de reação **Mistura VZV Q - PCR** para os furos na **Placa AD** como previamente estabelecido no **Plano de trabalho**.

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

2. Depositando precisamente na mistura de reação, transfira **20 µL** do **ADN extraído** da primeira amostra para o furo correspondente na **Placa AD** como previamente estabelecido no **Plano de trabalho**. Misture bem a amostra introduzindo com a pipeta o **ADN extraído** três vezes na mistura de reação. Certifique-se de que não cria quaisquer bolhas. Proceda da mesma forma com todo o restante **ADN extraído**.
3. Depositando precisamente na mistura de reação, transfira **20 µL** de **água de qualidade para biologia molecular ultra pura** (não fornecida com o produto) para o furo na **Placa AD** que contém o controlo de amplificação negativo, como previamente estabelecido no **Plano de trabalho**. Misture bem o controlo negativo introduzindo com a pipeta a **água de qualidade para biologia molecular ultra pura** três vezes na mistura de reação. Certifique-se de que não cria quaisquer bolhas.
4. 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 HHV6): com a pipeta, introduza

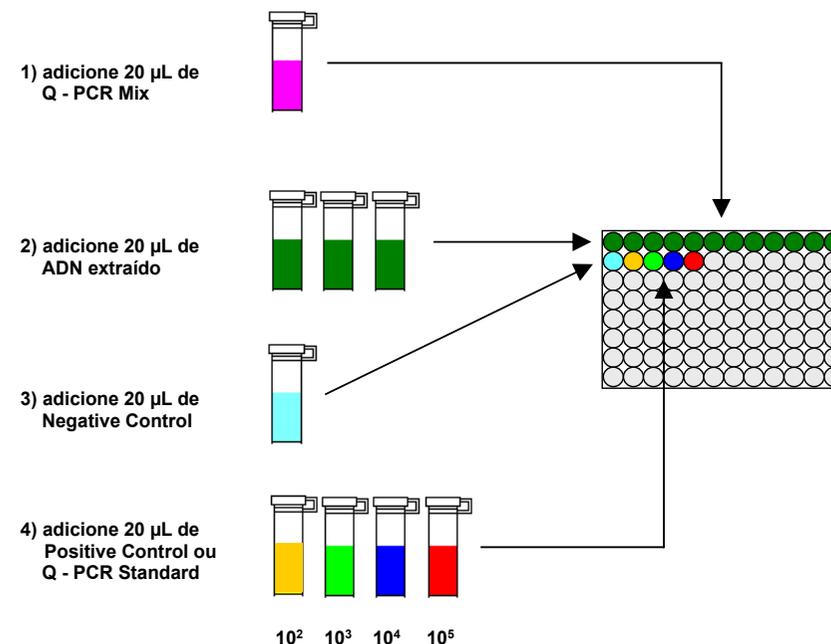
exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **VZV - ELITe Positive Control** ou em alternativa **VZV - ELITe Positive Control RF** no furo correspondente da **AD-plate**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o controlo positivo introduzindo com a pipeta o **VZV - ELITe Positive Control** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.

- quando for necessário um resultado **quantitativo** (quantificação de ADN de VZV): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **VZV Q - PCR Standard 10^2** no furo correspondente na **AD-plate**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o standard introduzindo com a pipeta o **VZV Q - PCR Standard** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma com os outros **Q - PCR Standards** (10^3 , 10^4 , 10^5).

5. Vede cuidadosamente a **Placa AD** utilizando a **Película vedante**.
6. Transfira a **Placa AD** para o ciclo térmico em tempo real na área de amplificação/deteção de produtos de amplificação e inicie o ciclo térmico da amplificação, guardando as definições da sessão com um identificador único e reconhecível (por ex., "ano-mês-dia-VZV-EGSpA").

Nota: No final do ciclo térmico, a **Placa AD** e os produtos de reação devem ser removidos do instrumento e eliminados de uma forma que não cause poluição ambiental. **Nunca retire a Película vedante da microplaca da amplificação**, para evitar qualquer fuga dos produtos de reação.

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



Análise dos resultados qualitativos

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

- Selecione o menu "Análise" e escolha "Pontos absolutos de quant/ajuste" (2 pontos)
- Selecione o grupo de amostras a serem analisadas

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

REF RTS035PLD

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

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

Para amostras de **Plasma**:

- defina manualmente o **Limiar** e **Banda de ruído** para o detetor FAM "VZV" para **0,55**;
- defina manualmente o **Limiar** e **Banda de ruído** para o detetor VCI "CI" para **1.2**

Para amostras de **sangue total**:

- defina manualmente o **Limiar** e **Banda de ruído** para o detetor FAM "VZV" para **0,80**;
- defina manualmente o **Limiar** e **Banda de ruído** para o detetor VCI "CI" para **1.5**

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

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

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

Se o resultado da reação de amplificação de **Positive control** for **Ct > 25** ou **Ct não determinado** para HHV6, o ADN alvo não foi corretamente detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação ou deteção (distribuição incorreta da mistura de reação ou do controlo positivo, degradação da mistura de reação ou do controlo positivo, definição incorreta da posição do controlo positivo, definição incorreta do ciclo térmico) que podem originar resultados incorretos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

* **Nota:** Quando este produto for usado para a quantificação de ADN de VZV, foram preparadas as reações de **Q - PCR Standard** em vez da reação de **Controlo positivo**. Neste caso, valide a amplificação e a deteção através da referência à reação de amplificação de **Q - PCR Standard 10⁵ (Ct ≤ 25)**.

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

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

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

Durante as reações de amplificação para cada **amostra**, o valor de **Ct** do VZV 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).

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

REF RTS035PLD

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

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

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct não determinado** para VZV e **Ct ≤ 35** para o Controlo Interno, o ADN do VZV não foi detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode excluir-se o facto de o ADN do VZV 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 VZV 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 VZV de elevada eficiência. Neste caso, a amostra é adequada e o resultado positivo do ensaio é válido.

Análise dos resultados quantitativos

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

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

Os valores de **Ct** para o VZV 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 Equivalentes do genoma por reação, desde 25.000.000 a 250 Equivalentes do genoma por mL de sangue total utilizando o sistema de extração **MagNA Pure 24** (ver Características de desempenho), como mostrados na tabela seguinte:

Resultado da amostra Detetor FAM "VZV"	Equivalentes do genoma VZV por reação
Quantidade > 1 x 10 ⁶	MAIS DE 1.000.000
1,0 x 10 ¹ ≤ Quantidade ≤ 1 x 10 ⁶	= Quantidade
Quantidade < 1,0 x 10 ¹	MENOS DE 10

Os resultados (**Quantidade**) relacionados com cada **amostra** (Janela de análise) são usados para calcular as **cópias** de VZV 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 e plasma colhido em EDTA e urina e o sistema de extração **MagNA Pure 24** e o resultado tiver de ser **expresso em cópias/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para sangue total e plasma e MagNA Pure 24

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

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade analítica: limite de deteção

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

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

Amostras	N	positivos	negativos
10 cópias de ADN de plasmídeo + 150.000 cópias de pBETAGLOBINA	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 registo₁₀ entre uma diluição e a seguinte) de ADN de plasmídeo contendo o produto de amplificação, cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. Os pontos do painel de 10⁷ moléculas por reação a 10¹ moléculas por reação foram testadas em 9 réplicas para realização da amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. 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 (10² cópias/20 µL).

O limite superior do intervalo de medição linear foi definido a 10⁸ cópias/reação, dentro de um algoritmo desde a concentração mais alta do standard de amplificação Q - PCR Standard (10⁵ 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	1.000.000

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 1%, dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ 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 7% dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ 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 medida de cerca de 12% dentro do intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ 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 calibrado QCMD 2017 Varicella-Zoster virus DNA EQA Panel (Qnostics Ltd, RU). Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas através da realização da extração utilizando o sistema de extração automática **MAGNA Pure 24** e amplificação utilizando produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o "MagNA Pure 24"		
Amostra	Alvo	Positivo/réplicas
VZVDNA17S-01	VZV Oka	2/2
VZVDNA17S-02	Negativo	0/2
VZVDNA17S-03	VZV Oka	2/2
VZVDNA17S-04	VZV Oka	2/2
VZVDNA17S-05	VZV Oka	2/2
VZVDNA17S-06	VZV Ellen	2/2
VZVDNA17S-07	VZV Ellen	2/2
VZVDNA17S-08	VZV Ellen	2/2
VZVDNA17S-09	VZV Ellen	2/2
VZVDNA17S-10	VZV Ellen	2/2

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

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

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o "MagNA Pure 24"	
Amostra	Positivo/réplicas
VZVMQP01-Alto	2/2
VZVMQP01-Médio	2/2
VZVMQP01-Baixo	2/2
VZVMQP01-Negativo	0/2

Todas as amostras positivas 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 VZV adicionando VZVMQP01-High (Qnostics, Ltd, Reino Unido), e 30 amostras de plasma colhidas em EDTA, negativas para ADN de VZV, que foram reforçadas com ADN de VZV adicionando VZVMQP01-High (Qnostics, Ltd, Reino Unido).

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 VZV	30	30	0
Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de VZV	30	30	0

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

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio associado às amostras de sangue total e de plasma foi de 100%.

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 36 amostras de sangue total colhido em EDTA presumivelmente negativas para ADN de VZV e 34 amostras de plasma colhido em EDTA presumivelmente negativas para ADN de VZV.

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 VZV	36	0	36
Plasma colhido em EDTA e presumivelmente negativo para ADN de VZV	34	1	34

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

A especificidade de diagnóstico do ensaio associado às amostras de sangue total e de plasma foi de 100%.

Nota: Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e os instrumentos estão registados no Ficheiro técnico do produto "VZV ELITe MGB® Kit", FTP RTS035PLD.

REFERÊNCIAS

- A. J. Wakefield et al. (1992) *J Med Virology* **38**: 183 - 190
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 e 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.

Não existem dados disponíveis relativos aos desempenhos do produto com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: zaratogas de lesões mucocutâneas, líquido amniótico.

Use este produto apenas com instrumentos validados e amostras clínicas associadas indicados 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 VZV, 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.

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 VZV não é detetado no ADN extraído da amostra; mas não se pode excluir que o ADN de VZV tenha 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 VZV.

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.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

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, do controlo positivo ou dos standards. Verifique os volumes da mistura de reação, do controlo positivo ou dos standards.
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.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

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

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

Fluorescência de fundo irregular ou elevada nas reações

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

Erro 30103 no ELITe InGenius

Causas possíveis	Soluções
Concentração demasiado alta do alvo na amostra.	Se for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR: - repita a amplificação com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR Only" (apenas PCR) ou - repita a extração com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular da amostra 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 produzidos pela Life Technologies Corporation e são vendidos ao abrigo de contratos de licenciamento celebrados entre a ELITechGroup S.p.A. e respetivas sucursais e a Life Technologies Corporation. O preço de compra deste produto inclui direitos exclusivos, não transmissíveis, de utilização apenas desta quantidade do produto exclusivamente para atividades do comprador que estejam diretamente relacionadas com diagnósticos em humanos. Para obter mais informações sobre a aquisição de uma licença deste produto para outros fins que não os acima indicados, contacte o Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Telefone: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. E-mail: outlicensing@thermofisher.com.

Os reagentes de deteção ELITe MGB® são abrangidos por um ou mais 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 licenciantes concedem quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, para quaisquer outros fins.

ELITe MGB® e o logótipo ELITe MGB® estão registados como marcas comerciais 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.

Ficoll® é uma marca comercial registada da GE Healthcare.

VZV ELITe MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS035PLD



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

A. Intended use

The «VZV ELITe MGB® Kit» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of human herpetic Varicella - Zoster virus (VZV)** 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 VZV 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
VZV	Major DNA binding protein (ORF 29)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

- › Whole Blood EDTA, Plasma EDTA, CSF

D. Kit content

VZV 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
- › **VZV - ELITe Standard:** STD035PLD
- › **VZV - ELITe Positive Control:** CTR035PLD
- › **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
- › CPE Internal Control volume 10 µL
- › Total eluate volume 100 µL
- › PCR eluate input volume 20 µL
- › Q-PCR Mix volume 20 µL
- › Unit of quantitative result Copies/mL
- › Frequency of controls 15 days
- › Frequency of calibration 60 days

G. Performance ELITe InGenius® and ELITe BeGenius®

Matrix	Limit of Detection	Linearity Range	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	100 cp / mL	100 – 25,000,000	96% 27/28*	100% 34/34*
Plasma	69 cp / mL	69 – 25,000,000	100% 30/30*	100% 30/30*
CSF	69 cp / reaction	69 – 25,000,000	100% 20/20*	100% 22/22*

*confirmed samples/ tested samples

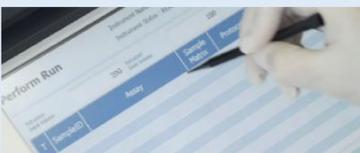
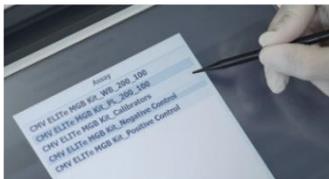
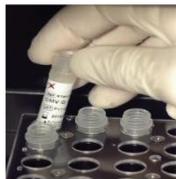
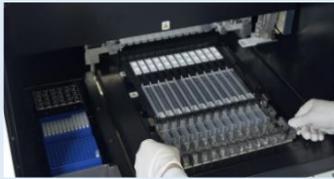
H. Procedures ELITE InGenius®

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: VZV Q-PCR Standard in the "Calibration menu" Verify controls: VZV 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 handheld 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>1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above</p>	<p>5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position: Primary tube or Secondary tube</p>	<p>6. Load the Internal Control in the inventory block</p>
<p>7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, extraction tube and primary sample racks</p>	<p>8. Close the door Start the run</p>	<p>9. Archive the eluate sample</p>

L. Procedures ELITE BeGenius®

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

Before analysis

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

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

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

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

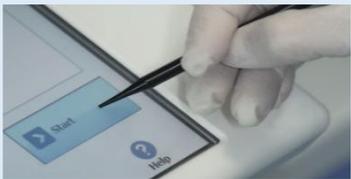
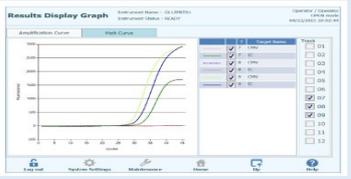
3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"

4. Select the "Assay protocol" of interest

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

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

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

8. Close the door. Start the run

9. View, approve and store the results


Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

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

VZV ELITe MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Ref: RTS035PLD



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

A. Intended use

The «VZV ELITe MGB® Kit» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of human herpesic Varicella - Zoster virus (VZV)** 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 VZV 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
VZV	Major DNA binding protein (ORF 29)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA

› Plasma EDTA

› Cerebrospinal fluid

D. Kit content

VZV 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
- ›

- › VZV ELITe Standard: STD035PLD
- › VZV - ELITe Positive Control: CTR035PLD
- › CPE - Internal Control: CTCPE
- › 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	10 gEq/reaction	100% (30/30)*	100% (29/29)*
	Plasma	10 gEq/reaction	100% (30/30)*	100% (30/30)
	CSF	10 gEq/reaction	100% (22/22)*	100% (24/24)*
ELITe GALAXY - ABI	Whole blood	100 gEq/mL	100% (29/29)*	100% (35/35)*
	Plasma	69 gEq/mL	100% (29/29)*	100% (34/34)*
	CSF	10 gEq/reaction	100% (20/20)*	100% (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	700 µL	85 µL	10 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

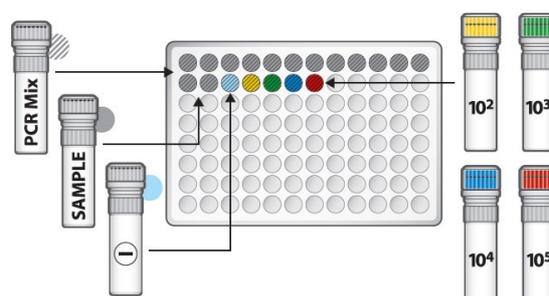
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "VZV" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition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

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

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

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw VZV 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	VZV 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

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

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ cp/reaction or approximately from 100 to 10⁷ cp/mL.

VZV ELITE MGB® Kit used with Cobas-Z 480 PCR instruments

Ref.: RTS035PLD



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

A. Intended use

The «**VZV ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for **the detection and quantification of the DNA of human herpesic Varicella - Zoster virus (VZV)** 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 VZV 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
VZV	Major DNA binding protein (ORF 29)	FAM
Internal Control	human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

- › **Whole blood EDTA**
- › **Plasma EDTA**

D. Kit content

VZV 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
- › **VZV - ELITE Positive Control**: CTR035PLD
- › **VZV ELITE Standard**: STD035PLD
- › **CPE Internal Control**: CTRCPE

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole blood	10 cp/reaction	100% (30/30)*	100% (36/36)*
	Plasma	10 cp/reaction	100% (30/30)*	100% (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

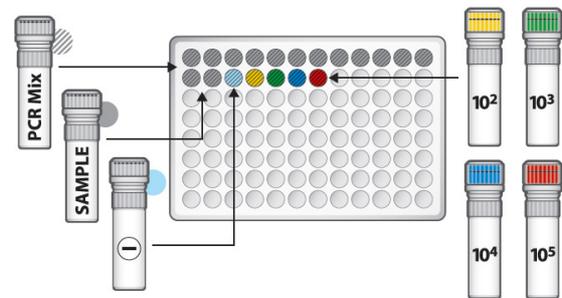
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "VZV" detector with "FAM channel 465 -510"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC channel 540 - 580"

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 VZV 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	VZV 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

VZV 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 VZV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction. The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ copies/reaction or approximately from 100 to 10⁷ copies/mL.