





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 23/01/2024

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

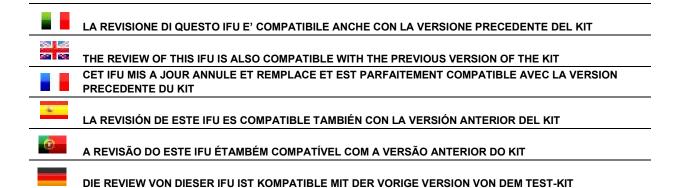
«HHV7 ELITe MGB® Kit» Ref. RTS037PLD

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

- Extension of the use of the product in association with «ELITe BeGenius®» instrument (REF INT040) and whole blood and plasma matrices.
- Update of PERFORMANCE CHARACTERISTICS:
 - o LoD, LLoD and ULoD values confirmed on matrix
 - o Repeatability and Reproducibility calculated on matrix
 - Internal Cut-off value changed from 36 to 35

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE







ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Torino ITALY

Sede: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11 E-mail: emd.support@elitechgroup.com Website: www.elitechgroup.com

HHV7 ELITe MGB® Kit

reagentes para PCR em tempo real do ADN

REF RTS037PLD





ÍNDICE

UTILIZAÇÃO PREVISTA	página 1
PRINCÍPIOS DO ENSAIO	página 2
DESCRIÇÃO DO PRODUTO	página 2
MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO	página 2
MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO	página 2
OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS	página 3
AVISOS E PRECAUÇÕES	página 4
AMOSTRAS E CONTROLOS PARA O ELITe InGenius e ELITe BeGenius	página 5
PROCEDIMENTO DO ELITe InGenius	página 7
PROCEDIMENTO DO ELITe BeGenius	página 12
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITe InGenius e ELITe BeGenius	página 17
AMOSTRAS E CONTROLOS PARA OUTROS SISTEMAS	página 23
PROCEDIMENTOS DE OUTROS SISTEMAS	página 24
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM OUTROS SISTEMAS	página 32
REFERÊNCIAS	página 34
LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	página 35
RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	página 36
SÍMBOLOS	página 39
NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	página 40
ANEXO: GUIA DE INICIAÇÃO RÁPIDA	página A

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto HHV7 ELITE MGB® Kit é um ensaio qualitativo e quantitativo da amplificação de ácidos nucleicos para a deteção e quantificação do ADN do herpesvírus humano 7 (HHV7) em amostras de ADN extraídas de sangue total colhido em EDTA e plasma colhido em EDTA e líquido cefalorraquidiano (LCR).

O ensaio foi validado em associação com os instrumentos **ELITe InGenius®** e **ELITe BeGenius®**, sistemas automatizados e integrados para a extração, a PCR em tempo real e a interpretação dos resultados, usando amostras de sangue total e plasma colhidas em EDTA.

O ensaio está validado em associação com o **7300 Real-Time PCR System e o 7500 Real-Time PCR System**, usando amostras humanas de sangue total, plasma colhido em EDTA e líquido cefalorraquidiano.

O produto destina-se para utilização no diagnóstico e monitorização de infeções de HHV7, junto com dados clínicos do doente e outros resultados de teste de laboratório.

HHV7 ELITe MGB® Kit

reagentes para PCR em tempo real do ADN



PRINCÍPIOS DO ENSAIO

O ensaio é uma PCR em tempo real quantitativo que deteta ADN de HHV7, isolado de amostras e amplificado usando o reagente do ensaio **HHV7 Q PCR Mix** que contém primers e sondas com tecnologia ELITE MGB e TaqMan[™] MGB[®].

As sondas ELITE MGB e TaqMan MGB são ativadas quando hibridizam com os correspondentes produtos da PCR. O **ELITE InGenius** e o **ELITE BeGenius** monitorizam o aumento da fluorescência e calculam os ciclos de limiar (Ct) e as temperaturas de fusão (Tm). A quantidade de ADN de HHV7 é calculada com base numa curva de calibração armazenada.

Nas sondas ELITe MGB, os fluoróforos são inativados no estado de cadeia única de espiral aleatória da sonda. Os fluoróforos são ativados no duplex amplicon / sonda dado que o inativador está espacialmente separado do fluoróforo. Ressalva-se que o fluoróforo não é clivado durante a PCR e pode ser utilizado para a análise da dissociação e o cálculo da temperatura de fusão.

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O HHV7 ELITE MGB Kit fornece o reagente do ensaio HHV7 Q - PCR Mix, uma mistura de PCR otimizada e estabilizada que contém os primers e sondas específicos de:

- HHV7, região do gene da proteína do capsídeo (U57), detetado no Canal HHV7; a sonda é estabilizada por MGB, inativada pelo Eclipse Dark Quencher⊚ e é marcada pelo corante FAM,
- Controlo interno (Ic), específico para o IC2 da sequência de ADN artificial, detetado no Canal IC; a sonda é estabilizada por MGB, inativada pelo Eclipse Dark Quencher® e identificada pelo corante AquaPhluor® 525 (AP525).

A **HHV7 Q - PCR Mix** contém também tampão, cloreto de magnésio, trifosfatos nucleótidos, fluoróforo AP593 (análogo do ROX ou Cy5) como referência passiva para normalização da fluorescência, a enzima Uracil-N-glicosidase (UNG) para inativar a contaminação pelo produto de amplificação e a polimerase de ADN de início a quente.

O produto **HHV7 ELITE MGB Kit** contém reagentes suficientes para **96 testes** no **ELITe InGenius** e **ELITE BeGenius**, sendo usados 20 µL por reação.

O produto **HHV7 ELITE MGB Kit** contém reagentes suficientes para **100 testes noutros sistemas**, sendo usados $20~\mu$ L por reação.

O HHV7 ELITE MGB Kit pode também ser usado em associação com instrumentos equivalentes.

MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
HHV7 Q - PCR Mix ref. RTS037PLD	Mistura de reagentes para o tubo de PCR em tempo real com tampa transparente	4 x 540 μL	-

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- Câmara de fluxo laminar.
- Luvas de nitrilo sem pó descartáveis ou material semelhante.
- Misturador de vórtice.
- Microcentrífuga de bancada (~3.000 RPM).
- Microcentrífuga de bancada (~13.000 RPM).
- Termomisturador.
- Micropipetas e pontas estéreis com filtro de aerossol ou pontas de deslocação positiva estéreis (0,5-10 μL, 2-20 μL, 5-50 μL, 50-200 μL, 200-1000 μL).
- Tubos com tampa de parafuso esterilizados de 2,0 mL (Sarstedt, Alemanha, ref. 72.694.005).
- 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.

SCH mRTS037PLD_pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 1/40** SCH mRTS037PLD_pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 2/40**

reagentes para PCR em tempo real do ADN



OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

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

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

Instrumentos e software	Produtos e reagentes
ELITE InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA ref. INT030) ELITe InGenius Software versão 1.3.0.17 (ou superior) HHV7 ELITe_STD, protocolo do ensaio com parâmetros para a análise dos Calibradores. HHV7 ELITe_PC, Protocolo de Ensaio com parâmetros para análise do Positive Control HHV7 ELITe_NC, Protocolo de Ensaio com parâmetros para análise do Negative Control HHV7 ELITe_WB_200_100, Protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostra do sangue total HHV7 ELITe_PL_200_100, Protocolo de Ensaio com parâmetros para análise de amostra de plasma ELITe BeGenius (EG SpA ref. INT040) ELITe BeGenius Software versão 2.1.0. (ou superior) HHV7 ELITe_Be_STD, Protocolo de Ensaio com parâmetros para análise de Calibradores HHV7 ELITe_ Be_PC, Protocolo de Ensaio com parâmetros para análise do Positive Control. HHV7 ELITe_ Be_NC, Protocolo de Ensaio com parâmetros para análise do Negative Control HHV7 ELITe_ Be_WB_200_100, Protocolo de Ensaio com parâmetros para análise de amostra do sangue total HHV7 ELITe_ Be_PL_200_100, Protocolo de Ensaio com parâmetros para análise de amostra do sangue total	ELITe InGenius SP200 (EG SpA, ref. INT032SP200) ELITe InGenius SP 200 Consumable Set (EG SpA, ref. INT032CS) ELITe InGenius PCR Cassette (EG SpA, ref. INT035PCR), ELITe InGenius Waste Box (EG SpA, ref. F2102-000) 300 µL Filter Tips Axygen (Coming Life Sciences Inc., ref. TF-350-L-R-S) apenas com o ELITe InGenius 1000 µL Filter Tips Tecan (Tecan, Switzerland, ref. 30180118) com o ELITe BeGenius apenas CPE – Internal Control (EG SpA, ref. CTRCPE) HHV7 ELITe Standard (EG SpA, ref. STD037PLD) HHV7 – ELITe Positive Control (EG SpA, ref. CTR037PLD)
7300 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, ref. 4351101) QIAsymphony® SP/AS (QIAGEN GmbH, Ref. 9001297, 9001301) NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux SA, Ref. 200111)	MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (LifeTechnologies, ref. N8010560) CPE – Internal Control (EG SpA, ref. CTRCPE) HHV7 ELITe Standard (EG SpA, ref. STD037PLD) HHV7 – ELITe Positive Control (EG SpA, ref. CTR037PLD) QIAsymphony® Midi kit (QIAGEN GmbH, Ref. 931236) NucliSeNS® easyMAG® Reagents (bioMérieux SA, Ref. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135)
7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, ref. 4406985) QlAsymphony SP/AS (QlAGEN GmbH, Ref. 9001297, 9001301) NucliSENS easyMAGe (bioMérieux SA, Ref. 200111)	MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL (Life Technologies, ref. 4346906) CPE – Internal Control (EG SpA, ref. CTRCPE) HHV7 ELITe Standard (EG SpA, ref. STD037PLD) HHV7 – ELITe Positive Control (EG SpA, ref. CTR037PLD) QlAsymphony Mid ikit (QIAGEN GmbH, Ref. 931236) NucliSENS easyMAG Reagents (bioMérieux SA, Ref. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135)

AVISOS E PRECAUÇÕES

Este produto foi concebido para utilização exclusiva in-vitro.

Avisos e precauções gerais

Manuseie e elimine todas as amostras biológicas como se fossem infeciosas. Evite o contacto direto

HHV7 ELITe MGB® Kit

reagentes para PCR em tempo real do ADN



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

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

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

Nunca deve pipetar soluções com a boca.

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

Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.

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

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

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

Não utilize o produto após a data de validade indicada.

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

Não use reagentes de lotes diferentes.

Não use reagentes de outros fabricantes.

Avisos e precauções para biologia molecular

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

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

Quando a sessão de amplificação for configurada manualmente, é necessário ter disponíveis batas, luvas e ferramentas de laboratório que sejam exclusivamente usadas para a extração/preparação de reacões de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação.

Nunca transfira batas, luvas ou ferramentas de laboratório da área designada para a amplificação/deteção de produtos de amplificação para a área designada para a extração/preparação de reações de amplificação.

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

As amostras devem ser adequadas e, se possível, exclusivas para este tipo de análise. As amostras devem ser manuseadas sob uma câmara de fluxo laminar. As pipetas usadas no manuseamento de amostras devem ser usadas exclusivamente para este fim específico. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, estar livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

Os reagentes devem ser manuseados sob uma câmara de fluxo laminar. As pipetas usadas no manuseamento dos reagentes devem ser usadas exclusivamente para este fim. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, estar 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 PCR Cassette devem ser manuseadas com cuidado de modo a evitar a emanação do produto da PCR para o ambiente e a contaminação da amostra e do reagente.

Avisos e precauções específicos para os componentes

Componente	Temperatura de armazenamento	Utilização a partir da primeira abertura	Ciclos de congelação/descongelação	Estabilidade de bordo (ELITe InGenius e ELITe BeGenius)
HHV7 Q - PCR Mix	-20°C ou inferior (protegido da luz)	um mês	até cinco	até cinco sessões separadas* de três horas cada ou até 7 horas consecutivas (2 sessões consecutivas de 3 horas cada e o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão)

^{*}com congelamento intermédio

SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 3/40** SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 4/40**

reagentes para PCR em tempo real do ADN



AMOSTRAS E CONTROLOS para o ELITe InGenius e ELITe BeGenius

Amostras

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

		Condiçã	ies de transporte	/armazenament	:0
Amostra	Requisitos de colheita	+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2 / +8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Sangue Total	EDTA	≤ 24 horas	≤ 72 horas	≤ 1 mês	> 1 mês
Plasma	EDTA	≤ 24 horas	≤ 72 horas	≤ 1 mês	> 1 mês

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

Para realizar o testes de amostras no **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius**, devem ser usados os seguintes Protocolos de Ensaio (Assay Protocols). Estes protocolos de DIV foram especificamente validados com os **ELITe InGenius ou ELITe BeGenius** com as matrizes indicadas.

	Protocolos de ensaio para o HHV7 ELITe MGB Kit			
Amostra	Instrumento	Nome do protocolo de ensaio	Relatório	Características
Sangue	ELITe InGenius	HHV7 ELITe_WB_200_100	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 10 µL
total	ELITe BeGenius	HHV7 ELITe_Be_WB_200_100	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 10 µL
Plasma	ELITe InGenius	HHV7 ELITe_PL_200_100	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 10 µL

HHV7 ELITe MGB® Kit reagentes para PCR em tempo real do ADN



	Protocolos de ensaio para o HHV7 ELITe MGB Kit			
Amostra	Instrumento	Nome do protocolo de ensaio	Relatório	Características
	ELITe BeGenius	HHV7 ELITe_Be_PL_200_100	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 10 µL

Para todos os protocolos, transferir a amostra para o Tubo de extração para (ELITe InGenius) ou Tubo Sarstedt 2 mL (para ELITe BeGenius) é opcional.

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

Nota: A pipetagem de amostras para o tubo de extração ou para o tubo Sarstedt de 2 mL pode gerar contaminação. Utilize as pipetas adequadas e siga todas as recomendações reportadas na secção "Advertências e precauções".

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

Consulte "Substâncias Potencialmente Interferentes" na secção Caraterísticas de Desempenho para verificar os dados relativos a substâncias interferentes.

Não use plasma colhido em heparina, a qual é um conhecido inibidor da transcrição reversa e da PCR.

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.

Calibradores e controlos da PCR

A curva de calibração tem de ser gerada e aprovada para cada lote de reagente de PCR.

- Para a curva de calibração, utilize os quatro níveis de produto HHV7 ELITe Standard (não fornecido com este kit) com os Protocolos do Ensaio HHV7 ELITe_STD ou HHV7 ELITe_Be_STD.

Os resultados do controlo da PCR têm de ser gerados e aprovados para cada lote de reagente de PCR.

- Para o Positive Control, use o produto HHV7 ELITE Positive Control (não fornecido com este kit)
 com os protocolos de ensaio (Assay Protocols) HHV7 ELITE PC or HHV7 ELITE BE PC.
- Para o Negative Control, utilize água de grau biológico molecular (não fornecida com este kit) com os Protocolos de Ensaio (Assay Protocols) **HHV7 ELITE NC** ou **HHV7 ELITE BE NC**.

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

As curvas de validação expiram após 60 dias e, nesse momento, é necessário voltar a executar a calibração.

Os resultados do controlo da PCR expiram após **15 dias** e, nesse momento, é necessário voltar a executar os Positive Controls e Negative Controls.

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

- for usado um novo lote de reagentes,
- os resultados da análise de controlo da qualidade se encontrarem fora da especificação (ver o parágrafo seguinte).
- se for realizada qualquer reparação ou manutenção significativa nos instrumentos ELITe InGenius ou ELITe BeGenius.

SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 5/40** SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 6/40**

reagentes para PCR em tempo real do ADN



Controlos da qualidade

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

PROCEDIMENTO do ELITe InGenius

O procedimento para utilização do **HHV7 ELITE MGB Kit** com o sistema **ELITe InGenius** consiste em três passos:

PASSO 1	Verificação da prontidão do sistema		
		A) Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR]	
	Preparação da sessão	B) Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])	
PASSO 2		C) Execução da calibração (PCR Only [Apenas PCR])	
		D) Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [Apenas PCR])	
	Revisão e O 3 aprovação de resultados	A) Validação da Curva de calibração	
PASSO 3		B) Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control	
FA330 3		C) Validação dos resultados da amostra	
		D) Elaboração do relatório do resultado da amostra	

PASSO 1 – Verificação da disponibilidade do sistema

Antes de iniciar a sessão:

- ligue o ELITe InGenius e inicie sessão no modo "CLOSED",
- no menu "Calibração" na página inicial, verifique se os Calibradores (HHV7 Q PCR Standard) estão aprovados e válidos (Estado) para o lote da PCR Mix a ser utilizada. Caso não haja calibradores válidos para o lote PCR Mix, realize a calibração conforme descrito nas secções seguintes,
- no menu "Controls" da página inicial, verifique se os controlos de PCR (HHV7 Positive Control,
 HHV7 Negative Control) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de PCR Mix a ser utilizado.
 Caso não haja controlos de PCR válidos disponíveis para o lote da PCR Mix execute os controlos de PCR conforme descrito nas secções seguintes,
- escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela EG SpA (consulte "Amostras e Controlos").

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

Os protocolos para análise qualitativa estão disponíveis a pedido.

PASSO 2 - Configuração da sessão

O HHV7 ELITe MGB Kit pode ser usado no ELITe InGenius para realizar:

- A. Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR],
- B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR]),
- C. Execução da calibração (PCR only [Apenas PCR]),
- D. Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [Apenas PCR]).

Todos os parâmetros requeridos estão incluídos no Protocolo de ensaio disponível no instrumento e são automaticamente carregados guando o Protocolo de ensaio é selecionado.

Nota: O **ELITe InGenius** pode ser ligado ao "Laboratory Information System" (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS), que permite descarregar a informação da sessão. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

Antes de configurar uma execução:

Descongele os tubos da **HHV7 Q PCR Mix** necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para **24 testes** em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

HHV7 ELITe MGB® Kit reagentes para PCR em tempo real do ADN



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

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

	A Evenueão de empetro (Extract + DCD	P. Evenueño de empetros eluídes (PCP Only
	A. Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR])	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])
1	Identifique amostras e, se necessário, descongele à temperatura ambiente, misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Descongele os tubos de CPE necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Cada tubo é suficiente para 12 extrações.	Descongele os tubos de eluição contendo os ácidos nucleicos extraídos à temperatura ambiente. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.
2	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial).	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial).
3	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 μ L e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 μ L.	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 µL.
4	Para cada amostra, atribua um Rastreamento e introduza a "SampleID" (SID) digitando ou lendo o código de barras da amostra.	Para cada amostra, atribua um Rastreamento e introduza a "SampleID" (SID) digitando ou lendo o código de barras da amostra.
5	Selecione o Protocolo de Ensaio na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").	Selecione o Protocolo de Ensaio na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").
6	Certifique-se de que o "Protocol" (Protocolo) apresentado é: "Extract + PCR"(Extraction + PCR)	Selecione "PCR Only" (Apenas PCR) na coluna "Protocol" (Protocolo).
7	Selecione a posição de carregamento da amostra como "Extraction Tube" "(Tubo de extração) na coluna "Sample Position" (Posição da amostra). Certifique-se de que o "Dilution factor" (Fator de diluição) é "1".	Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" (Posição da amostra) é "Elution Tube (bottom row)" (Tubo de eluição [linha inferior]). Certifique-se de que o "Dilution factor" (Fator de diluição) é "1".
8	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
9	Carregue a CPE e PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) em referência a "Load List" ((Lista de carregamentos) e introduza o número de lote, data de validade e o número de reações da CPE and PCR Mix para cada tubo.	Carregue a PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) em referência a "Load List" (Lista de carregamentos) e introduza o número de lote, data de validade e o número de reações da PCR Mix para cada tubo.
10	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
11	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.
12	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
13	Carregue a PCR Cassette, os cartuchos de extração Elite InGenius SP 200 e todos os consumíveis e amostras necessários para serem extraídos	Carregue a PCR Cassette, os tubos de Eluição com as amostras extraídas
14	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
15	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
16	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).

SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 7/40** SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 8/40**

reagentes para PCR em tempo real do ADN



	C. Execução da calibração (PCR only [Apenas PCR])	D. Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [Apenas PCR])
1	Descongele os tubos de Q-PCR Standard (Cal1: Q-PCR Standard 10², Cal2: Q-PCR Standard 10³, Cal3: Q-PCR Standard 10³, Cal3: Q-PCR Standard 10°) à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.	Descongele os tubos de Positive Control à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Prepare o Negative Control, transfira pelo menos 50 µL de água de qualidade para biologia molecular para um "Elution tube" (Tubo de eluição), fornecido com o ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial).	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial).
3	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial a de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 µL.	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 μL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 μL.
4	Para o Q-PCR Standard, atribua a "Track" (Calha), selecione o Protocolo de Ensaio (ver "Amostras e Controlos") na coluna "Assay" (Ensaio) e introduza o número de lote e a data de expiração do reagente.	Selecione o Protocolo de Ensaio na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos"). Introduza o número do lote e a data de validade do Positive Control e da água de grau biológico molecular.
5	Certifique-se de que "PCR Only" (Apenas PCR) está selecionado na coluna "Protocol" (Protocolo).	Certifique-se de que "PCR Only" (Apenas PCR) está selecionado na coluna "Protocol" (Protocolo).
6	Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" (Posição da amostra) é "Elution Tube (bottom row)" (Tubo de eluição [linha inferior]).	Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" (Posição da amostra) é "Elution Tube (bottom row)" (Tubo de eluição [linha inferior]).
7	Carregue a PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) em referência a "Load List" (Lista de carregamentos) e introduza o número de lote, data de validade e o número de reações da PCR Mix para cada tubo.	Carregue a PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) consultando a "Load List" (Lista de carregamentos) e introduza o número de lote, data de validade e o número de reações da PCR Mix para cada tubo.
8	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
9	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua os "Tip Racks" (Racks de pontas), se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.
10	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
11	Carregue a PCR Cassette e os tubos de Q - PCR Standard.	Carregue a PCR Cassette, e o Positive Control e Negative Control.
12	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
13	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
14	Prima "Start" (Iniciar)	Prima "Start" (Iniciar).

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

Nota: No final da execução a restante amostra extraída no **Elution tube** (Tubo de eluição) deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 ±10 °C durante não mais de um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da operação, a **PCR Mix** pode ser retirada do instrumento, tapada e armazenada a -20 °C ou menos ou pode ser mantida no bloco frigorífico durante até 7 horas (2 sessões de 3 horas cada e o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão), misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a próxima sessão.

Nota: No final da execução, a restante **Q-PCR Standard** pode ser removida do instrumento, fechada e guardada a -20 °C ou menos. Evite derramar o Q - PCR Standard.

HHV7 ELITe MGB® Kit

reagentes para PCR em tempo real do ADN



Nota: Os HHV7 Q-PCR Standard podem ser usados para 4 sessões separadas de 2 horas cada.

Nota: No final da execução o restante **Positive Control** deve ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C ou menos. Evite o derrame do Positive Control. O restante **negative control** deve ser eliminado.

Nota: O HHV7 Positive Control pode ser usado para 4 sessões separadas de 3 horas cada.

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.

PASSO 3 - Revisão e aprovação dos resultados

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

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

Nota: O sistema **ELITe InGenius** pode ser ligado ao "Laboratory Information System" (servidor de informação da localização - LIS), que permite carregar os resultados da sessão no centro de dados laboratoriais. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

O **ELITe InGenius** gera os resultados utilizando o **HHV7 ELITe MGB Kit** através do seguinte procedimento:

- 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.

A. Validação da Curva de calibração

O **ELITe InGenius software** interpreta os resultados do PCR para o alvo das reações do Calibrador com os parâmetros do protocolo de ensaio **HHV7 ELITE STD**. A Ct resultante versus a concentração produz a curva da calibração.

As curvas de calibração, específicas para o lote de reagente da PCR, são guardadas na base de dados (Calibração). Podem ser visualizados e aprovados pelos utilizadores "Administrator" (Administrador) ou "Analyst" (Analista), seguindo as instruções na GUI.

A curva da calibração expira após 60 dias.

Nota: Se a curva de calibração não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem "Failed" no erã "Calibration". Neste caso, os resultados não podem ser aprovados e têm de ser repetidas as reações de amplificação do Calibrador. Além disso, se as amostras foram incluídas na execução, estas não são quantificadas e também têm de ser repetidas para a geração de resultados quantitativos.

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

O software **ELITe InGenius** interpreta os resultados da PCR para os alvos das reações de Positive Control e Negative Control com os parâmetros dos protocolos de ensaio **HHV7 ELITe_PC** e **HHV7 ELITe_NC**. Os valores de Ct resultantes são convertidos em concentrações e usados para validar o sistema (lote de reagente e instrumento).

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

Os resultados do Positive Control e Negative Control expiram após 15 dias

SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 9/40** SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 10/40**

reagentes para PCR em tempo real do ADN



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 subsequentes, os resultados são analisados pelo software para garantir que os desempenhos do sistema se encontram dentro dos critérios de aceitação, mostrados nos traçados do Gráfico de controlo. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

Nota: Se o resultado do Positive Control e Negative Control não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem "Failed" (Reprovado) no ecrã "Controls" (Controlos). Neste caso, os resultados não podem ser aprovados e as execuções de Positive Control e Negative Control têm de ser repetidas.

Nota: Se o Positive Control e Negative Control forem inválidos 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 da amostra

O ELITe InGenius software interpreta os resultados de PCR para o alvo (Canal HHV7) e do Controlo Interno (Canal IC) com os parâmetros do Protocolo de Ensaio HHV7 ELITe_WB_200_100 e HHV7 ELITe_PL_200_100. Os valores de Ct do alvo resultante são convertidos em concentração.

Os resultados são mostrados no ecrã "Result Display" (Exibição dos resultados).

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

1) Curva de calibração	Estado
HHV7 Q-PCR Standard	APROVADO
2) Positive Control	Estado
HHV7 Positive Control	APROVADO
3) Negative Control	Estado
Negative Control de HHV7	APROVADO

Os resultados da amostra são automaticamente interpretados pelo **ELITe InGenius software** usando os parâmetros do protocolo de ensaio.

Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado.

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

Resultado da execução da amostra	Interpretação
HHV7:ADN detetado, quantidade igual a "XXX" cópias/mL	Foi detetado ADN de HHV7 na amostra no intervalo de medição de ensaio, a sua concentração é mostrada.
HHV7:ADN detetado, quantidade inferior a "LLoQ" (LldQ) cópias/mL	Foi detetado ADN de HHV7 na amostra, a sua concentração é inferior ao ensaio - limite inferior de quantificação
HHV7:ADN detetado, quantidade superior ao "ULoQ" (LSdQ) cópias/mL	Foi detetado ADN de HHV7 na amostra, a sua concentração é superior ao ensaio - limite superior de quantificação
HHV7:ADN não detetado ou inferior ao "LoD" (LdD) cópias/mL	Não foi detetado ADN de HHV7 na amostra. A amostra é negativa para ADN do alvo 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 (extração incorreta, transferência de inibidores). O teste deve ser repetido.

Amostras indicadas como "Invalid - Retest Sample" (Inválido - testar novamente amostra): caso, o ARN do Controlo Interno não foi detetado eficientemente devido a problemas nos passos de colheita, extração ou PCR da amostra (por ex. amostragem incorreta, degradação ou perda do ADN durante a extração ou inibidores na eluição), que pode causar resultados incorretos.

HHV7 ELITe MGB® Kit

reagentes para PCR em tempo real do ADN



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" (Extrair + PCR) (ver "Troubleshooting" (Resolução de problemas))

As amostras reportadas como "HHV7:DNA Not detected or below "LoD" copies/mL" (ADN de HHV7 não detetado ou abaixo do "LdD" de cópias/mL) são adequadas para análise mas não foi detetado HHV7. Neste caso, a amostra pode ser negativa para ADN de HHV7 ou o ADN de HHV7 está presente numa concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver "Características de desempenho").

Amostras positivas do ADN de HHV7 a uma concentração abaixo do Limite de Deteção (e Limite Inferior da Quantificação) do ensaio, se detetado, são relatados como "HHV7:DNA Detected, quantity below "LLoQ" copies/mL" "HHV7:ADN detetado, quantidade abaixo do LldQ cópias/mL (consulte "Características de desempenho").

São detetadas amostras positivas de ADN de HHV7 no Intervalo de Medição Linear (consulte "Características de desempenho") que são relatadas como "HHV7: ADN detetado, quantidade igual a "XXX" copies / mL" (XXX cópias/mL).

amostras positivas de ADN de HHV7 que estão acima do Limite Superior de Quantificação são relatadas como "HHV7: DNA Detected, quantity beyond "ULoQ" copies/mL" (HHV7:ADN detetado, quantidade acima do LSdQ cópias/mL) e não são adequadas para quantificação. Se necessário a amostra pode ser diluída antes da extração ou PCR e novamente testada de forma a serem obtidos resultados dentro do intervalo de medicão linear do ensaio.

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

Os resultados da execução da Amostra são guardados na base de dados e, se válidos, podem ser aprovados (Exibição dos resultados) pelos utilizadores "Administrator" (Administrador) ou "Analyst" (Analista), seguindo as instruções na GUI. A partir da janela "Result Display" (Exibição de resultados) é possível imprimir e guardar os resultados da execução da amostra como "Sample Report" (Relatório de amostra) e "Track Report" (Relatório de calha).

D. Elaboração do relatório do resultado da amostra

Os resultados da amostra são guardados na base de dados e os relatórios podem ser exportados como "Sample Report" (Relatório da amostra) e "Track Report" (Relatório da calha).

- O "Sample Report" (Relatório da amostra) apresenta os detalhes dos resultados pela amostra selecionada (SID).
 - O "Track Report" (Relatório da calha) apresenta os detalhes do resultado pelo Rastreio selecionado.
- O "Sample Report" (Relatório da amostra) e o "Track Report" (Relatório da calha) podem ser impressos e assinados por pessoal autorizado.

PROCEDIMENTO do ELITe BeGenius

O procedimento para utilização do **«HHV7 ELITE MGB Kit»** com o sistema **ELITE InGenius** consiste em três passos:

PASSO 1	Verificação da prontidão do sistema				
PASSO 2		A) Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR]			
	Preparação da sessão	B) Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])			
		C) Execução da calibração (PCR Only [Apenas PCR])			
		D) Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [Apenas PCR])			
	Revisão e aprovação de resultados	A) Validação da Curva de calibração			
PASSO 3		B) Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control			
PA330 3		C) Validação dos resultados da amostra			
		D) Elaboração do relatório do resultado da amostra			

SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 11/40** SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 12/40**

reagentes para PCR em tempo real do ADN



PASSO 1 - Verificação da disponibilidade do sistema

Antes de iniciar a sessão:

- ligue o ELITe BeGenius e inicie sessão no modo "CLOSED",
- no menu "Calibrations" (Calibrações) na página inicial, verifique se os Calibradores (HHV7 Q -PCR Standard) estão aprovados e válidos (Estado) para o lote da HHV7 PCR Mix a ser utilizada.
 Caso não haja calibradores válidos para o lote de HHV7 PCR Mix, realize a calibração conforme descrito nas secções seguintes,
- no menu "Controls" (Controlos) da página inicial, verifique se os controlos de PCR (HHV7 Positive Control, HHV7 Negative Control) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de
 HHV7 PCR Mix a ser utilizado. Caso não haja controlos de PCR válidos disponíveis para o lote da
 HHV7 PCR Mix execute os controlos de PCR conforme descrito nas secções seguintes,

escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela EG SpA (consulte "Amostras e Controlos").

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

Os protocolos para análise qualitativa estão disponíveis a pedido.

PASSO 2 - Configuração da sessão

O HHV7 ELITe MGB Kit pode ser usado no ELITe BeGenius para realizar:

- A. Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR],
- B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR]),
- C. Execução da calibração (PCR only [Apenas PCR]),
- D. Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [Apenas PCR]).

Todos os parâmetros requeridos estão incluídos no protocolo de ensaio disponível no instrumento e são automaticamente carregados quando o protocolo de ensaio é selecionado.

Nota: O **ELITE BeGenius** pode ser ligado ao "Laboratory Information System" (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS), que permite descarregar a informação da sessão. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

Antes de configurar uma execução:

Descongele os tubos da **HHV7 PCR Mix** necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para **24 testes** em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

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

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

HHV7 ELITe MGB® Kit

<mark>reagentes para PCR em tempo real do ADN</mark>



	A. Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR])	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])
1	Identifique amostras e, se necessário, descongele à temperatura ambiente, misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Descongele os tubos de CPE necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Cada tubo é suficiente para 12 extrações.	Se necessário, descongele os Elution tubes contendo os ácidos nucleicos extraídos à temperatura ambiente. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.
2	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecră "Home" (Página inicial).	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial).
3	Retire os Suportes da "Cooler Unit" (Unidade refrigeradora) e coloque-os na mesa de preparação.	Retire os "Racks" da "Lane 1, 2 and 3" (Via 1, 2 e 3) (L1, L2, L3) da "Cooler Unit" (Unidade refrigeradora) e coloque-os na mesa de preparação
4	Selecione o "Run mode": "Extract + PCR"(Extrair + PCR)	Selecione o "Run mode": "PCR Only".
5	Carregue as amostras no "Sample Rack" (Rack da amostra). Quando os tubos secundários "2 mL Tubes" (Tubos de 2 mL) forem carregados, use adaptadores azuis para o "Sample Rack" (Rack da amostra).	Carregue as amostras no "Elution Rack" (Rack de eluição).
6	Insira o "Sample Rack" (Rack da amostra) na "Cooler Unit" (Unidade refrigeradora começando a partir da "Lane 5" (Via 5) (L5). Se necessário, insira a "Sample ID" (Identificação da amostra) (SID) para cada "Position" usada. Se forem carregados tubos secundários, assinale "2 mL Tube" (Tubo de 2 mL). Se os tubos secundários não possuírem código de barras, digite manualmente a "Sample ID" (Identificação da amostra)).	Insira o "Elution Rack" (Rack de eluição) na "Cooler Unit" (Unidade refrigeradora) começando a partir da "Lane 3" (Via 3) (L3). Se necessário, para cada "Position" (Posição), insira a "Sample ID" (Identificação da amostra), a "Sample matrix" (Matriz da amostra), o "Extraction kit" (Kit de extração) e o "Extracted eluate vol." (Volume de eluato extraído).
7	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
8	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 μL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 μL.	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 µL.
9	Selecione o Protocolo de Ensaio na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos")	Selecione o Protocolo de Ensaio na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos")
10	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
11	Quando forem processadas mais de 12 amostras, repita o procedimento a partir do ponto 6.	Quando forem processadas mais de 12 amostras, repita o procedimento a partir do ponto 6.
12	Coloque os "Elution tubes" no "Elution Rack" (os tubos de eluição podem ser etiquetados com código de barras para melhorar a capacidade de localização).	não aplicável
13	Insira o "Elution Rack" na "Cooler Unit" começando a partir da "Lane 3" (L3). Quando mais de 12 amostras forem processadas, repita usando a "Via 2" (L2).	não aplicável
15	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	não aplicável
16	Carregue o CPE e a PCR Mix no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).	Carregue a PCR Mix no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).
17	Insira o "Reagent/Elution Rack" na "Cooler Unit" na "Lane 2" (L2) se estiver disponível, ou na "Lane 1" (L1). Se necessário, para cada reagente de PCR Mix e/ou CPE, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).	Insira o "Reagent/Elution Rack" na "Cooler Unit" na "Lane 2" (L2) se estiver disponível, ou na "Lane 1" (L1). Se necessário, para cada reagente 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).
18	Selecione "Next" (Próximo) para continuar	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
19	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua

SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 13/40** SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 14/40**

HHV7 ELITe MGB® Kit reagentes para PCR em tempo real do ADN



	A. Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR])	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])
	Racks", se necessário.	"Tip Racks", se necessário.
20	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
21	Coloque o "PCR Basket" (Cesto de PCR) com a "PCR Cassette" (Cassete de PCR) na área do inventário.	Coloque o "PCR Basket" (Cesto de PCR) com a "PCR Cassette" (Cassete de PCR) na área do inventário.
22	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
23	Carregue o "Extraction Basket" (Cesto de extração) com os cartuchos de extração "ELITe InGenius SP 200" e os consumíveis de extração necessários.	não aplicável
24	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
25	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).

C. Execução da calibração (PCR only [Apenas PCR])	D. Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [Apenas PCR])
Descongele os tubos Q-PCR Standard tubes (Cal1: Q-PCR Standard 10², Cal2: Q-PCR Standard 10³, Cal3: Q-PCR Standard 10⁴, Cal4: Q-PCR Standard 10⁴) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.	Descongele os tubos de Positive Control à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Prepare o Negative Control, transfira pelo menos 50 µL de água de qualidade para biologia molecular para um "Elution tube" (Tubo de eluição), fornecido com o ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial).	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial)
Retire os "Racks" de "Lane 1, 2 and 3" (L1, L2, L3) da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.	Retire os "Racks" de "Lane 1, 2 and 3" (L1, L2, L3) da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
Selecione o "Run mode: PCR Only".	Selecione o "Run mode": "PCR Only".
Carregue os tubos de standard de Q-PCR no "Elution Rack" (Rack de eluição).	Carregue os tubos de Positive Control e Negative Control no "Elution Rack" (Rack de eluição).
Insira o "Elution Rack" (Rack de eluição) na "Cooler Unit" (Unidade refrigeradora) começando a partir da "Lane 3" (Via 3) (L3). Se necessário, para cada "Position" (Posição) introduza o "Reagent name" (Nome do reagente) e o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).	Insira o "Elution Rack" (Rack de eluição) na "Cooler Unit" (Unidade refrigeradora) começando a partir da "Lane 3" (Via 3) (L3). Se necessário, para cada "Position" (Posição) introduza o "Reagent name" (Nome do reagente) e o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).
Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
Verifique o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) (600 μL) e o "Extracted Elute Volume" (Volume de eluato do extraído) (50 μL).	Verifique o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) (600 μL) e o "Extracted Elute Volume" (Volume de eluato do extraído) (50 μL).
Selecione o Protocolo de Ensaio na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").	Selecione o Protocolo de Ensaio na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").
Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
Carregue a PCR Mix no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).	Carregue a PCR Mix no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).
Insira o "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição) na "Cooler Unit" (Unidade refrigeradora) na "Lane 2" (Via 2) (L2) Se necessário, para cada PCR Mix, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).	Insira o "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição) na "Cooler Unit" (Unidade redrigeradora) na "Lane 2" (Via 2) (L2). Se necessário, para cada 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).
	Descongele os tubos Q-PCR Standard tubes (Cal1: Q-PCR Standard 10², Cal2: Q-PCR Standard 10³, Cal3: Q-PCR Standard 10⁴, Cal4: Q-PCR Standard 10⁵) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial). 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 tubos de standard de Q-PCR no "Elution Rack" (Rack de eluição). Insira o "Elution Rack" (Rack de eluição) na "Cooler Unit" (Unidade refrigeradora) começando a partir da "Lane 3" (Via 3) (L3). Se necessário, para cada "Position" (Posição) introduza o "Reagent name" (Nome do reagente) e o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações). Selecione "Next" (Próximo) para continuar. Verifique o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) (600 µL) e o "Extracted Elute Volume" (Volume de eluato do extraído) (50 µL). Selecione "Next" (Próximo) para continuar. Carregue a PCR Mix no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição). Insira o "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição) na "Cooler Unit" (Unidade refrigeradora) na "Lane 2" (Via 2) (L2) Se necessário, para cada PCR Mix, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data

HHV7 ELITe MGB® Kit reagentes para PCR em tempo real do ADN



	C. Execução da calibração (PCR only [Apenas PCR])	D. Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [Apenas PCR])
14	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" ((área dos reagentes) e substitua o suporte(s) de pontas, se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua o suporte(s) de pontas, se necessário.
15	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
16	Carregue o "PCR Basket" (Cesto de PCR) com a "PCR Cassette" (Cassete de PCR) na área do inventário.	Carregue o "PCR Basket" (Cesto de PCR) com a "PCR Cassette" (Cassete de PCR) na área do inventário.
17	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
18	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
19	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).

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

Nota: No final da execução a restante amostra extraída no **Elution tube** (Tubo de eluição) deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 ±10 °C durante não mais de um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da operação, a **PCR Mix** pode ser retirada do instrumento, tapada e armazenada a -20 °C ou abaixo ou pode ser mantida no bloco frigorífico durante até 7 horas (2 sessões de 3 horas cada e o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão), misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a próxima sessão.

Nota: No final da execução, o restante **Q-PCR Standard** pode ser removido do instrumento, fechado e guardado a -20 °C ou menos. Evite derramar o Q - PCR Standard.

Nota: Os HHV7 Q-PCR Standard podem ser usados para 4 sessões separadas de 2 horas cada.

Nota: No final da execução o restante **Positive Control** deve ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C ou menos. Evite derramar **Positive Control**. O restante **negative control** deve ser eliminado.

Nota: O HHV7 Positive Control pode ser usado para 4 sessões separadas de 3 horas cada.

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.

PASSO 3 - Revisão e aprovação dos resultados

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

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

Nota: O **ELITE BeGenius** pode ser ligado ao "Laboratory Information System" (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS), que permite descarregar a informação da sessão. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

- O **ELITe BeGenius** gera os resultados utilizando o **HHV7 ELITe MGB Kit** através do seguinte procedimento:
 - 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: Para mais informações, consulte o mesmo parágrafo do Procedimento do ELITe InGenius.

SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 15/40** SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 16/40**

reagentes para PCR em tempo real do ADN



CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM O ELITE InGenius e ELITE BeGenius

Sensibilidade analítica: Limite de branco com sangue total

Devido a uma elevada prevalência de HHV7 na população (cerca de 80%) indicada na literatura (Michael Kidd et al.), prevê-se uma determinada percentagem de resultados baixo positivos clinicamente não significativos ao analisar amostras de sangue total. Para obter a negatividade do ensaio com estas amostras é necessário avaliar um valor limite da Ct de HHV7 igual a 35 no ELITe InGenius e ELITe BeGenius.

Os resultados no ELITE InGenius estão mostrados na tabela abaixo.

Limite de branco do sangue total colhido em EDTA e ELITE InGenius						
Amostras N positivo negativo						
Sangue total colhido em EDTA e negativo para ADN de HHV7	35	0	35			

Os resultados no ELITE BeGenius estão mostrados na tabela abaixo.

Limite de branco do sangue total colhido em EDTA e ELITE BeGenius					
Amostras	N	positivo	negativo		
Sangue total colhido em EDTA e negativo para ADN de HHV7	20	0	20		

No teste de limite de branco, o HHV7 ELITE MGB Kit detetou corretamente todas as amostras testadas conforme esperado dentro do valor-limite de Ct definido para o alvo.

Sensibilidade analítica: Limite de deteção (LdD)

O 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 LdD deste ensaio foi testado no ELITe InGenius usando o ADN de plasmídeo que contém o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida pelo espetrofotómetro. O ADN de plasmídeo foi diluído a um título de 10 cópias/10 μ L na presença de ADN de plasmídeo contendo o controlo interno a um título de 20.000 cópias/10 μ L.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Amostras	N	positivo	negativo
10 cópias de ADN de plasmídeo HHV7 + 20.000 cópias de controlo interno	18	18	0

O valor do LdD teórico foi verificado testando no ELITe InGenius e ELITe BeGenius um universo de amostras de plasma em EDTA e sangue total em EDTA reforçadas com material de referência de HHV7 (ZeptoMetrix, ref. PINATHHV7-ST) à concentração indicada.

Os resultados obtidos confirmaram a alegada concentração para o alvo de HHV7 ELITe MGB Kit tanto no ELITe InGenius como no ELITe BeGenius.

Intervalo de medição linear

O intervalo de medição linear do HHV7 ELITe MGB Kit foi determinado com amostras de sangue total e plasma no ELITe InGenius e ELITe BeGenius.

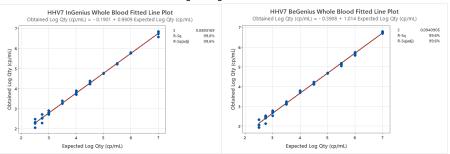
Para Sangue Total:

O intervalo de medição linear foi determinado usando um painel de diluições de plasmídeo contendo uma sequência do alvo de HHV7 em amostras de sangue total em EDTA negativas.

HHV7 ELITe MGB® Kit reagentes para PCR em tempo real do ADN



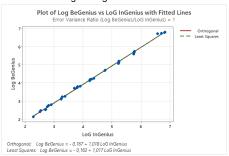
Os resultados são comunicados na figura seguinte.



O intervalo de medição linear como cópias/mL para o plasma em EDTA é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado na secção seguinte.

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.

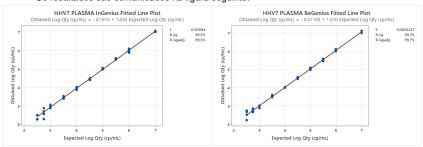
Os resultados estão resumidos na figura seguinte.



A análise de regressão ortogonal gerou um declive igual a -0,167 (95% Cl: -0,2256; -0,1075) e um declive igual a 1,018 (95% Cl: 1,0048; 1,0307). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0,999. Para plasma colhido em EDTA:

O intervalo de medição linear foi determinado com recurso a um painel de diluições de plasmídeo contendo uma sequência do alvo de HHV7 em amostras de Plasma em EDTA negativas.

Os resultados são comunicados na figura seguinte.



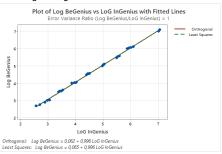
Os resultados obtidos pelo **ELITe InGenius e ELITe BeGenius** e os métodos de referência foram analisados por regressão ortogonal e linear para calcular a correlação entre os métodos.

SCH mRTS037PLD_pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 17/40** SCH mRTS037PLD_pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 18/40**

HHV7 ELITe MGB® Kit reagentes para PCR em tempo real do ADN



Os resultados estão resumidos na figura seguinte.



A análise de regressão ortogonal gerou uma interceção equivalente a 0,062 (95% CI 0,0053; 0,1194) e um declive igual a 0,996 (95% CI: 0,9845 – 1,0082). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0.999.

O intervalo de medição linear para o **sangue total e o plasma** colhidos em amostras de EDTA abrange um intervalo de concentração conforme indicado na tabela seguinte:

Intervalo de medição linear para o HHV7 ELITe MGB Kit e o ELITe InGenius e ELITe BeGenius						
Matriz	Limite inferior	Limite superior				
Sangue Total	500 cópias/mL	10.000.000 cópias/mL				
Plasma	500 cópias/mL	10.000.000 cópias/mL				

Repetibilidade

A repetibilidade do ensaio foi avaliada no ELITe BeGenius e no ELITE InGenius por análise de um painel de amostras de sangue total colhidas em EDTA negativas ou reforçadas com HHV7 (ZeptoMetrix, ref. PINATHHV7-ST).

Um exemplo dos resultados da repetibilidade intra-sessão (em um dia) no ELITe InGenius são mostrados na tabela seguinte.

Repetibilidade intra-sessão no ELITe InGenius						
Amostra		HHV	%Concordância			
Alliostia	Pos./Neg.	Ct médio	SD	% CV	/6Concordancia	
Negativo	0/8	N/A	N/A	N/A	100%	
3X o LoD	8/8	32,97	0,38	1,14	100%	
10X o LoD	8/8	31,18	0,29	0,92	100%	

Um exemplo dos resultados da repetibilidade intra-sessão (em um dia) no ELITe BeGenius são mostrados na tabela seguinte.

Repetibilidade intra-sessão no ELITe BeGenius							
Amostra		HHV	%Concordância				
Alliostia	Pos./Neg.	Ct médio	SD	% CV	/6Concordancia		
Negativo	0/8	N/A	N/A	N/A	100%		
3X o LoD	8/8	34,52	0,30	0,88	100%		
10X o LoD	8/8	32,36	0,22	0,69	100%		

Os resultados da repetibilidade inter-sessão (em dois dias) no ELITe InGenius são mostrados na tabela seguinte.

Repetibilidade inter-sessão no ELITe InGenius						
Amostra		HHV	0/ 0			
Amostra	Pos./Neg.	Ct médio	SD	% CV	%Concordância	
Negativo	0 / 16	N/A	N/A	N/A	100%	
3X o LoD	16 / 16	33,07	0,36	1,09	100%	
10X o LoD	16 / 16	31,17	0,24	0,77	100%	

HHV7 ELITe MGB® Kit reagentes para PCR em tempo real do ADN



Os resultados da repetibilidade inter-sessão (em dois dias) no ELITe BeGenius são mostrados na tabela seguinte.

Repetibilidade inter-sessão no ELITe BeGenius						
Amostra		HI	%Concordância			
Alliostia	Pos./Neg. Ct médio		SD	% CV	/oConcordancia	
Negativo	0 / 16	N/A	N/A	N/A	100%	
3X o LoD	16 / 16	34,41	0,49	1,42	100%	
10X o LoD	16 / 16	32,34	0,30	0,92	100%	

No teste de repetibilidade, o HHV7 ELITE MGB detetou todas as amostras conforme esperado e apresentou uma variabilidade máxima dos valores de Ct do alvo como %CV igual a 1,42%.

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do ensaio foi avaliada no ELITe BeGenius e no ELITE InGenius por análise de amostras de sangue total negativas para ADN de HHV7 colhidas em EDTA negativas ou reforçadas com HHV7 (Zeptometrix, ref. PINATHHV7-ST).

Os resultados da Reprodutibilidade Interlote (dois lotes) no ELITe InGenius são apresentados na tabela abaixo.

Repetibilidade interlote no ELITe InGenius						
Amostra		0/ 0				
Amostra	Pos. / Rep.	Ct médio	SD	%CV	%Concordância	
Negativo	0/8	-	-	-	100%	
3 X LdD	8/8	33,39	0,20	0,59	100%	
10 X LdD	8/8	31,39	0,18	0,57	100%	

Os resultados da Reprodutibilidade Interlote (dois lotes) no ELITe BeGenius são apresentados na tabela abaixo.

	Repetibilidade interlote no ELITe BeGenius						
Amostra		%Concordância					
Alliostia	Pos. / Rep.	Ct médio	SD	%CV	/6COIICOI Galicia		
Negativo	0/8	-	-	=	100%		
3 X LdD	8/8	34,58	0,14	0,42	100%		
10 X LdD	8 / 8	32,66	0,24	0,75	100%		

Os resultados da Reprodutibilidade inter-instrumento (em dois dias, dois lotes e dois instrumentos) no Elite BeGenius Elite mostrados na tabela abaixo.

	Reprodutibilidade inter-instrumento no ELITe InGenius						
Amostra		%Concordância					
Alliostra	Pos. / Rep.	o. Ct médio	SD	%CV	%Concordancia		
Negativo	0/8	-	-	-	100%		
3 X LdD	8/8	34,50	0,31	0,90	100%		
10 X LdD	8/8	32,61	0,23	0,69	100%		

Os resultados da Reprodutibilidade inter-instrumento (em dois dias, dois lotes e dois instrumentos) no Elite BeGenius Elite mostrados na tabela abaixo.

Capacidade de reprodução interinstrumento no ELITe BeGenius						
A	HHV7					
Amostra	Pos. / Rep.	Ct médio	SD	%CV	%Concordância	
Negativo	0/8	-	-	-	100%	
3 X LdD	8/8	33,25	0,26	0,79	100%	
10 X LdD	8/8	31,26	0,21	0,66	100%	

No teste de reprodutibilidade, o HHV7 ELITe MGB detetou todas as amostras conforme esperado e apresentou uma variabilidade máxima dos valores de Ct do alvo como %CV igual a 0,90%.

SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 19/40** SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 20/40**

reagentes para PCR em tempo real do ADN



Especificidade do diagnóstico: Confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi avaliada com o **ELITe InGenius** através da análise de amostras clínicas de sangue total e plasma colhido em EDTA.

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**.

Os resultados estão resumidos na tabela sequinte.

Amostras	N	positivo	negativo	% de especificidade diagnóstico	do
Amostras de sangue total colhidas em EDTA	38	0	38	100%	
Amostras de plasma colhidas em EDTA	33	0	33	100%	

Todas as amostras de sangue total e plasma foram válidas para a análise. O valor limite de Ct do alvo de HHV7 foi aplicado apenas para as amostras de sangue total.

A especificidade do diagnóstico do HHV7 ELITe MGB Kit em associação com o sangue total e o plasma colhidas em EDTA foi igual a 100%.

O valor-limite de Ct do CI foi definido para 35 para as amostras de sangue total e de plasma colhidas em EDTA tanto para o InGenius como para o BeGenius.

Sensibilidade de diagnóstico: Confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada com o **ELITe InGenius** através da análise de amostras clínicas de sangue total e plasma colhidas em FDTA

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 utilizando amostras de sangue total e plasma colhidas em EDTA negativas para HHV7 reforçadas com "Human Herpes Virus Type 7 Stock –(NATHHV7-ST)" (ZeptoMetrix Corporation) a 1000 cópias / mL.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo	%Sensibilidade de diagnóstico
Sangue total colhido em EDTA reforçado para ADN de HHV7	34	34	0	100%
Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de HHV7	33	33	0	100%

Todas as amostras foram detetadas corretamente como sendo positivas.

A sensibilidade do diagnóstico do HHV7 ELITe MGB Kit em associação com o sangue total e o plasma colhidas em EDTA foi igual a 100%.

Nota: Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e o instrumento estão registados no Ficheiro técnico do produto "HHV7 ELITE MGB Kit", FTP037PLD.

HHV7 ELITe MGB® Kit

reagentes para PCR em tempo real do ADN



AMOSTRAS E CONTROLOS PARA OUTROS SISTEMAS

Amostras

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

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 e guardadas à temperatura ambiente (+16/+26 °C) durante um período máximo de 24 horas, 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.

Nota: quando realizar a extração de ADN a partir de sangue total com o instrumento NucliSENS® easyMAG®, siga o protocolo de extração Generic 2.0.1 e siga estas instruções: transfira 100 μL da amostra para a tira de 8 furos, carregue a tira no instrumento e efetue a extração sem incubação de lise. Após o instrumento ter adicionado o NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer, sem remover a tira, misture três vezes o conteúdo da tira através da pipeta de vários canais, utilizando o número do programa 3. Faça a incubação durante 10 minutos, em seguida adicione 5 μL de CPE para o controlo interno e a NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica ao conteúdo da tira pela pipeta de vários canais, utilizando o número do programa 3; em seguida, prossiga com a extração. Elua os ácidos nucleicos em 50 μL de tampão de eluição.

Nota: quando realizar a extração de ADN de sangue total com o instrumento QlAsymphony® SP/AS e o kit QlAsymphony® DNA Mini kit com a versão do software 3.5, utilize o protocolo de extração Virus Blood_200_V4_default IC e siga estas instruções: o instrumento é capaz de utilizar um tubo primário, o volume de amostra necessário para a extração de 200 μL, é sempre necessário um volume morto mínimo de 100 μL. Adicione 5 μL de CPE para cada amostra requerida ao tampão de ATE. Carregue no instrumento, na ranhura do "controlo interno", os tubos que contêm a solução, como indicado no manual de utilizador do kit; indique a posição onde os eluatos serão distribuídos e específique o volume de eluição de 60 μL. Para obter mais informações sobre o procedimento de extração, siga as indicações no manual de utilizador do kit.

Líquido cefalorraquidiano

As amostras de líquido cefalorraquidiano 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.

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 e efetue a extração. Após os 10 minutos de incubação, adicione 5 µL de CPE para o controlo interno antes de adicionar a NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica e prossiga com a extração. Elua os ácidos nucleicos em 100 µL de tampão de eluição.

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 ÁDN genómico humano no ADN extraído da amostra pode inibir a reacão de amplificação.

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

SCH mRTS037PLD_pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 21/40** SCH mRTS037PLD_pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 22/40**

reagentes para PCR em tempo real do ADN



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 kit) adicionada à reação no lugar do ADN extraído a partir da amostra.

Para o positive control, utilize o produto **HHV7 - ELITe Positive Control** ou o produto **HHV7 ELITe Standard**.

Controlos da qualidade

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

PROCEDIMENTO NOUTROS SISTEMAS

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.

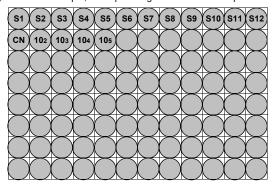
Antes de iniciar a sessão, e através da consulta da documentação do instrumento, é necessário:

- 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 HHV7 com o "dispositivo de relatório" = "FAM" e o "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) " e dar-lhe o nome "HHV7";
- 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" = "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 estas informações à **Ficha de Trabalho**

anexada no final deste manual ou imprima a configuração 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.



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.

HHV7 ELITe MGB® Kit reagentes para PCR em tempo real do ADN



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.
	· ·	
	94 °C	10 seg.
Amplificação e deteção (45 ciclos)	60 °C (aquisição de fluorescência)	30 seg.
	72 °C	20 seg.
	·	
	95 °C	15 seg.
Dissociação (opcional)	40 °C	30 seg.
(opcional)	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 HHV7 com o "dispositivo de relatório" = "FAM" e o "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) " e dar-lhe o nome "HHV7";
- definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda de controlo interno com o "dispositivo de relatório" = "VIC" (AP525 é semelhante ao VIC) e o "disposição de extinção" = "nenhum " (não fluorescente) " e dar-lhe o nome "CI";
- para cada furo em utilização na microplaca, defina (Inspetor do furo) o "detetor" (tipo de fluorescência a ser medida), a "referência passiva" = "Cy5" (é usado AP593 em vez de Cy5, para a normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (amostra, controlo de amplificação negativo, controlo de amplificação positivo ou padrão de quantidade conhecido). Adicione esta informação à **Ficha de trabalho** anexada no final deste manual ou imprima a preparação da microplaca. A **Ficha de trabalho** deve ser atentamente seguida durante a transferência da mistura de reação e das amostras para os furos.

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

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

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

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

SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 23/40** SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 24/40**

reagentes para PCR em tempo real do ADN



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.		
	94 °C	10 seg.		
Amplificação e deteção (45 ciclos)	60 °C (aquisição de fluorescência)	30 seg.		
	72 °C	20 seg.		
	95 °C	15 seg.		
Dissociação	40 °C	1 min.		
(opcional)	80 °C	15 seg.		
	60 °C	15 sea.		

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;
- descongele os tubos da **HHV7 Q PCR Mix** necessários para a sessão, sem esquecer que cada tubo é suficiente para a preparação de **25 reações**. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo;
- descongele o **HHV7 Positive Control** ou os tubos **HHV7 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.
- pegue na **folha vedante da amplificação** que será usada durante a sessão, tendo cuidado para manusear a mesma com luvas sem pó e para não danificar.
- Com a pipeta, introduza exatamente 20 µL da HHV7 Q PCR Mix no fundo dos poços da microplaca da amplificação, como previamente estabelecido na Ficha de trabalho. Evite a criação de bolhas.

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

- 2. Com a pipeta, introduza exatamente, colocando na mistura de reação, 10 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.
- 3. Com a pipeta, introduza exatamente, colocando na mistura de reação, 10 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.

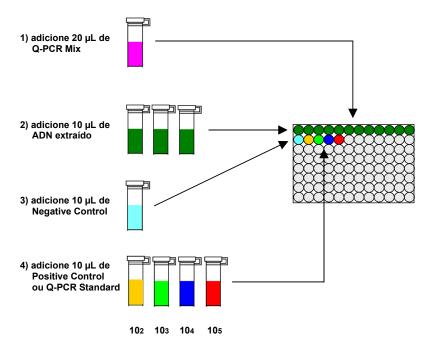
HHV7 ELITe MGB® Kit reagentes para PCR em tempo real do ADN



- 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 HHV7): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, 10 μL de HHV7 Positive Control no furo correspondente na microplaca da amplificação, como previamente estabelecido na Ficha de trabalho. Misture bem o controlo positivo introduzindo com a pipeta o volume de 10 μL três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.
 - Quando for necessário um resultado quantitativo (quantificação de ADN de HHV7): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, 10 μL de HHV7 Q PCR Standard 102 no poço correspondente na microplaca da amplificação, como previamente estabelecido na Ficha de trabalho. Misture bem o standard introduzindo com a pipeta o volume de 10 μL três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma com os HHV7 Q PCR Standards 103, 104, 105.
- Vede com precisão a microplaca da amplificação com recurso à folha vedante da amplificação.
- Transfira a microplaca da amplificação para o ciclo térmico em tempo real na área de amplificação/deteção de produtos de amplificação e inicie o ciclo térmico para a amplificação guardando a definição da sessão com um nome de ficheiro inequívoco e reconhecível (por ex., "anomês-dia-HHV7-ELITECHGROUP").

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.



SCH mRTS037PLD_pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 25/40** SCH mRTS037PLD_pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 26/40**

HHV7 ELITe MGB® Kit reagentes para PCR em tempo real do ADN



Nota: se a preparação da amplificação for realizada com o instrumento **QlAsymphony® 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.

Análise qualitativa dos resultados

Os valores registados da fluorescência emitida pela sonda específica do HHV7 (detetor FAM "HHV7") e pela sonda específica do controlo interno (detetor VCI "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 HHV7, a fluorescência FAM da sonda específica do HHV7 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 "HHV7" 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 "HHV7" para **0,2**;
- defina manualmente o Limiar para o detetor VIC "CI" para 0,1.

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

Na reação de amplificação **Positive Control***, o valor de **Ct** do HHV7 (Resultados > Relatório) é usado para validar a amplificação e a detecão como descrito na tabela seguinte:

Detetor de reação de controlo positivo FAM "HHV7"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação **Positive Control** for **Ct > 25** ou **Ct não determinado** para HHV7, 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 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 HHV7, foram preparadas as reações de Q - PCR Standard em vez da reação de Positive Control. Neste caso, valide a amplificação e a detecão através da referência à reação de amplificação de Q - PCR Standard 105 (Ct ≤ 25).

Na reação de amplificação do **Negative Control**, o valor da **Ct** do HHV7 (Resultados > Relatório) é usado para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Negative Control reaction detector FAM "HHV7"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct não determinado	NEGATIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação para o **Negative Control** for diferente de **Ct não determinado** (**não determinado**) para HHV7, o ADN alvo foi detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação (contaminação), que podem originar resultados incorretos e falsos positivos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

HHV7 ELITe MGB® Kit reagentes para PCR em tempo real do ADN



Na reação de amplificação de cada **amostra**, o valor de **Ct** do HHV7 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 para a região do gene da proteína do capsídeo (U57) do HHV7 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	Resultado do	ADM de IIIN/7	
detetor FAM "HHV7"	detetor VIC "IC"	amostra	ensaio	ADN de HHV7	
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 HHV7 e **Ct > 35** ou **Ct não determinado** para o Controlo interno, significa que foi impossível detetar eficientemente o ADN para o Controlo interno. Neste caso, ocorreram problemas durante o passo de amplificação (amplificação ineficiente ou inexistente) ou durante o passo de extração (degradação do ADN do controlo interno, amostra com um número de células demasiado baixo, perda de ADN durante a extração ou presença de inibidores no ADN extraído) que podem originar resultados incorretos e falsos negativos. A amostra não é adequada, o ensaio é inválido e precisa ser repetido, começando pela extração de uma nova amostra.

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct não determinado** para o HHV7 e **Ct ≤ 35** para o Controlo Interno, significa que o ADN do HHV7 não é detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode excluir-se o facto de o ADN do HHV7 ter um título mais baixo que o limite de deteção do produto (consulte 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 HHV7 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 HHV7. 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.

Os valores de Ct de HHV7 nas reações de amplificação dos quatro Q - PCR standardssão usados para calcular a Curva Standard (Resultados > Curva Standard) para a sessão de amplificação e para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Standard Curve detector FAM "HHV7"	Intervalo de aceitação	Amplificação/deteção
Coeficiente de correlação (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRETO

SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 27/40** SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 28/40**

HHV7 ELITe MGB® Kit reagentes para PCR em tempo real do ADN



Se o valor do **Coeficiente 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, 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 HHV7 na reação de amplificação de cada **amostra** e a Curva standard da sessão de amplificação são usados para calcular a **Quantidade** de ADN alvo presente nas reações de amplificação das amostras.

Este produto é capaz de quantificar desde 1.000.000 a 10 cópias de ADN da região de um gene de proteína do capsídeo (U57) de HHV7 na reação de amplificação, que corresponde aos Equivalentes do genoma por reação (intervalo de medição linear, consulte parágrafo Características de desempenho), tal como descrito na tabela sequinte:

Sample result detector FAM "HHV7"	Equivalentes do genoma HHV7 por reação		
Quantidade > 1 x 106	MAIS DE 1.000.000		
1 x 101 ≤ Quantidade ≤ 1 x 106	= Quantidade		
Quantidade > 1 x 101	MENOS DE 10		

Os resultados (**Quantidade**) de cada **amostra** (Resultados > Relatório) são usados para calcular os equivalentes do genoma (**gEq**) do HHV7 presente na amostra usada na extração (**Nc**) de acordo com esta fórmula:

Onde

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

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

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

Va é o volume do produto de extração usado na reação de amplificação expresso em uL:

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

Quando é usado o sistema de extração **NucliSENS® easyMAG®** com amostras de sangue total colhidas em EDTA e é necessário o resultado em **ingEq/mL**, a fórmula passa a ser:

Fórmula simplificada para sangue total e NucliSENS® easyMAG®	
Nc (gEq/mL) = 100 x Quantidade	

Quando é usado o sistema de extração **NucliSENS® easyMAG®** com amostras de líquido cefalorraquidiano e é necessário o resultado **em gEq/mL**, a fórmula passa a ser:

Quando é usado o kit de extração **QIAsymphony® SP/AS** com amostras de sangue total colhidas em EDTA e é necessário o resultado **expresso em gEq/mL**, a fórmula passa a ser:

HHV7 ELITe MGB® Kit

reagentes para PCR em tempo real do ADN



Cálculo dos limites do intervalo de medição linear

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

Quando é usado o kit de extração **NucliSENS® easyMAG®** com amostras de sangue total colhido em EDTA, a fórmula passa a ser:

Limites do intervalo de medição linear (gEq/mL) com NucliSENS® easyMAG®		
Limite inferior (gEq/mL) = 100 x 10 gEq		
Limite superior (gEq/mL) = 100 x 1.000.000 gEq		
de 1000 a 100.000.000 gEq/mL		

Quando é usado o sistema de extração **NucliSENS®** easyMAG® com líquido cefalorraquidiano, a fórmula passa a ser:

Limites do intervalo de medição linear (gEq/mL) com NucliSENS® easyMAG®		
Limite inferior (gEq/mL) = 20 x 10 gEq		
Limite superior (gEq/mL) = $20 \times 1.000.000 \text{ gEq}$		
de 200 a 20.000.000 gEq/mL		

Quando é usado o kit de extração **QlAsymphony**® **SP/AS** com amostras de sangue total colhido em EDTA, a fórmula passa a ser:

Limites do intervalo de medição linear (gEq/mL) com QIAsymphony® SP/AS		
Limite inferior (gEq/mL) = 45 x 10 gEq		
Limite superior (gEq/mL) = 45 x 1.000.000 gEq		
de 450 a 45.000.000 gEq/mL		

SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 29/40** SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 30/40**

reagentes para PCR em tempo real do ADN



CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO COM OUTROS SISTEMAS

Sensibilidade analítica: limite de deteção

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

A sensibilidade analítica deste ensaio, como limite de deteção, foi testado usando o ADN plasmídico que contém o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida pelo espetrofotómetro. O ADN plasmídico foi diluído a um título de 10 cópias/10 μL com CI-ADN, diluído a um título de 20.000 cópias/10 μL, no ADN genómico humano a um título de 500 ng/10 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	Nº	positivo	negativo
10 cópias de ADN plasmídico + 20.000 cópias de CI-ADN + 500 ng de ADN genómico humano	50	50	0

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 10 μL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A sensibilidade analítica deste ensaio foi determinada usando um painel de diluições (passos de diluição de 1 log10) de ADN de plasmídeo contendo o produto de amplificação, cuja concentração inicial foi medida pelo espetrofotómetro. 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 quadrado superior a 0,99).

O limite superior do intervalo de medição linear foi definido a 106 moléculas por reação, o que corresponde ao equivalente genómico por reação, dentro de 1 algoritmo da concentração mais alta do standard de amplificação Q - PCR Standard (105 moléculas/10 µL).

O limite inferior do intervalo de medição linear foi definido a 10 moléculas por reação, o que corresponde ao equivalente de genoma por reação, dentro de 1 algoritmo desde a concentração mais baixa do standard de amplificação Q - PCR Standard (102 moléculas/10 µL).

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

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

Os limites do intervalo de medição linear como **gEq/mL** referentes ao kit de extração usado são calculados na página 26.

Sensibilidade analítica: Precisão e exatidão

A precisão do ensaio, enquanto variabilidade dos resultados obtidos com várias réplicas de uma amostra testada dentro da mesma sessão, permitiu obter uma percentagem média do Coeficiente de variação (% CV) de cerca de 25,9% das quantidades medidas, dentro do intervalo de 106 moléculas a 101 moléculas nos 10 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 testada dentro da mesma sessão e a concentração teórica da amostra, permitiu obter uma percentagem média de Imprecisão (% Imprec.) de cerca de 9,0% das quantidades medidas, dentro do intervalo de 106 moléculas a 10 moléculas nos 10 μL de ADN adicionado à reação de amplificação.

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

HHV7 ELITe MGB® Kit

reagentes para PCR em tempo real do ADN



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

A sensibilidade analítica do ensaio, como eficiência de deteção e quantificação em diferentes qenótipos/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 **U57** do HHV7, revelou a respetiva conservação e ausência de mutações significativas.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi testada através da análise de algumas amostras clínicas positivas de ADN de HHV7.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 23 amostras de sangue total colhidas em EDTA (testadas com produto de amplificação agrupado CE IVD) que foram reforçadas em título igual a três vezes o limite de deteção para ADN de HHV7 com a amostra de referência certificada "HHV7 Culture Fluid", (Ref. 0810071CF, ZeptoMetrix, USA). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA reforçado para ADN de HHV7	23	23	0

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

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 25 amostras de líquido cefalorraquidiano negativas para ADN de HHV7 (testadas com produto de amplificação agrupado CE IVD) que foram reforçadas em título igual a três vezes o limite de deteção para ADN de HHV7 com a amostra de referência certificada "HHV7 Culture Fluid", (Ref. 0810071CF, ZeptoMetrix, USA). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração, com o sistema automático NucliSENS® easyMAG® e amplificação com ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Líquido cefalorraquidiano reforçado para ADN de HHV7	25	25	0

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi de 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 pueleótidos

A análise do alinhamento das sequências dos primários e da sonda fluorescente com as sequências disponíveis nas bases de dados para organismos diferentes do HHV7, incluindo o genoma completo de CMV, EBV, HHV6, os vírus humanos mais semelhantes ao HHV7, revelou a respetiva especificidade e a ausência de homologia significativa.

A especificidade analítica do ensaio, como ausência de reatividade cruzada com outros marcadores potencialmente interferentes, foi verificada utilizando algumas amostras clínicas negativas para ADN de HHV7 e positivas para outros agentes patogénicos.

A especificidade analítica foi verificada utilizando como material de referência 12 amostras de sangue total colhidas em EDTA que testaram negativo para ADN de HHV7 (testado com um produto de amplificação agrupado CE IVD), mas positivas para o ADN de outros agente patogénicos (CMV, EBV e HHV6). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

SCH mRTS037PLD_pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 31/40** SCH mRTS037PLD_pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 32/40**

HHV7 ELITe MGB® Kit reagentes para PCR em tempo real do ADN



Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue total colhido em EDTA, positivo para CMV	4	0	4
Sangue total colhido em EDTA, positivo para EBV	6	0	6
Sangue total colhido em EDTA, positivo para HHV6	1	0	1
Sangue total colhido em EDTA, positivo para HHV6 e EBV	1	0	1

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade diagnóstica do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi testada através da análise de algumas amostras clínicas negativas de ADN de HHV7.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 23 amostras de sangue total colhido em EDTA, negativas para ADN de HHV7, testadas com um produto de amplificação agrupado CE IVD. Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extracão e amplificação, por 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 HHV7	23	0	23

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

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 26 amostras de líquido cefalorraquidiano que estavam negativas para ADN de HHV7 (testadas com um produto de amplificação agrupado CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise: extração, com o sistema automático NucliSENS® easyMAG® 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 HHV7	26	1	25

Uma amostra devolveu um resultado positivo discordante para ADN de HHV7, com título menor que 1 cópia/reação. A discrepância pode ser explicada tendo em consideração que as amostras com títulos tão baixos podem devolver alternativa e aleatoriamente resultados positivos e negativos.

A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi de 96,1%.

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 "HHV7 ELITE MGB® Kit". FTP RTS037PLD.

REFERÊNCIAS

F. Drago et al. (1997) *Lancet* 349: 1367 - 1368 (anexo n° 1, 2 páginas); E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* <u>35</u>: e30 Michael Kidd et al. (1996) *The Journal of Infectious Diseases* 174: 396-401

K. Linnet et al. (2004) Clin. Chem. 50: 732 - 740.

HHV7 ELITe MGB® Kit

reagentes para PCR em tempo real do ADN



LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

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

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

O plasma colhido em EDTA deve ser obtido a partir de sangue total armazenado à temperatura ambiente ou +2 / +8 °C durante um máximo de 24 horas.

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: suspensões de leucócitos e granulócitos, líquido amniótico.

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

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

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

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

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

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

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

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 indica que o ARN do alvo não foi detetado no ARN extraído da amostra; no entanto, não pode negligenciar-se o facto de o ARN do alvo ter um título mais baixo que o limite de deteção do produto (Ver "Características de desempenho"). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

Os resultados obtidos com este produto podem, por vezes, ser inválidos devido a uma falha do controlo interno. Neste caso, a amostra deve ser retestada, começando pela extração; o que pode causar um atraso na obtenção dos resultados finais.

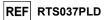
Possíveis polimorfismos, inserções ou deleções na região do ADN do alvo abrangida pelos primers do produto e pelas sondas podem prejudicar a deteção e quantificação do ADN alvo.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, os resultados obtidos com este produto têm de ser interpretados em combinação com todas as observações clínicas e resultados laboratoriais relevantes.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, existe um risco residual de obter resultados inválidos ou errados com este produto. Este risco residual não pode ser eliminado ou ainda mais reduzido. Nalguns casos, este risco residual pode contribuir para decisões erradas com potenciais efeitos perigosos para o doente. No entanto, este risco residual associado à utilização prevista do produto foi ponderado em relação aos potenciais benefícios para o paciente e foi considerado aceitável.

SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 33/40** SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 34/40**

reagentes para PCR em tempo real do ADN



RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

ELITe InGenius e ELITE BeGenius

Reação do Q-PCR Standard, curva standard ou reação do Controlo Positivo inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da Mistura de PCR, dos Q-PCR Standards e do Controlo Positivo (Positive Control). Verifique os volumes da Mistura PCR, dos Q-PCR Standards e do Controlo Positivo (Positive Control).
Degradação da PCR Mix.	Não use a PCR Mix durante mais de 7 sessões independentes (3 horas cada no bloco de refrigeração da área de inventário ou na unidade de refrigeração).
	Não utilize a PCR Mix durante mais de 3 sessões consecutivas (7 horas no bloco de refrigeração da área de inventário ou na unidade de refrigeração)
	Não deixe a PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos. Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Degradação dos Q-PCR Standards ou do Controlo Positivo.	Não use o Q-PCR Standard para mais de 4 sessões independentes (2 horas cada na área de extração ou na unidade de refrigeração).
	Não use o Positive Control para mais de 4 sessões independentes (3 horas cada na área de extração ou na unidade de refrigeração).
	Use novas alíquotas dos Q-PCR Standards ou do Controlo positivo (Positive Control).
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da PCR Mix e do Negative Control. Verifique os volumes da PCR Mix e do Negative Control.
Contaminação do Negative Control.	Não use o Negative Control para mais do que 1 sessão. Utilize uma nova alíquota de água de grau de biologia molecular.
Contaminação da PCR Mix.	Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Contaminação da área de extração, dos racks, do bloco de inventário ou da unidade de refrigeração.	Limpe as superfícies com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos e as pontas utilizadas.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Reação da amostra inválida		
Causas possíveis	Soluções	
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da Mistura de PCR, do Controlo Interno e da amostra. Verifique os volumes da PCR Mix, do controlo Interno e da amostra.	
Degradação da PCR Mix.	Não use a PCR Mix durante mais de 7 sessões independentes (3 horas cada na Área do Inventário ou na Unidade Refrigeradora).	
	Não utilize a PCR Mix durante mais de 3 sessões consecutivas (7 horas na Área do Inventário, Bloco de frio ou na Unidade Refrigeradora).	
	Não deixe a PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos.	
	Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.	
Degradação do modelo do Controlo Interno.	Utilize uma nova alíquota de Controlo Interno.	

HHV7 ELITe MGB® Kit reagentes para PCR em tempo real do ADN



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

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

Erro no cálculo de Ct	
Causas possíveis	Soluções
Concentração demasiado alta do alvo na amostra ou amostra com sinal de fluorescência anómalo.	Se for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR, selecione o rastreio relacionado com a amostra e aprove manualmente o resultado como sendo positivo. Se não for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR, selecione o rastreio relacionado com a amostra e aprove manualmente o resultado como sendo negativo, ou deixe-o como inválido. Se for necessário um valor de Ct: - repita a amplificação de amostra eluída com uma diluição 1:10 em água de grau de biologia molecular numa sessão "PCR Only" (Apenas PCR) - repita a extração da amostra com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular numa sessão "Extract + PCR" (Extrair + PCR).

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

SCH mRTS037PLD_pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 35/40** SCH mRTS037PLD_pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 36/40**

HHV7 ELITe MGB® Kit reagentes para PCR em tempo real do ADN



Plataforma aberta:

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 reações para os furos da microplaca e cumpra a ficha de trabalho. Verifique os volumes da mistura de reação distribuída. Verifique os volumes do controlo positivo ou standard distribuído.	
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 contri positivo ou standard no instrumento. Verifique as definições do ciclo térmico no instrumento.	

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

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".

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

HHV7 ELITe MGB® Kit

reagentes para PCR em tempo real do ADN



SÍMBOLOS

REF

Número de catálogo.



Limite máximo da temperatura.



Código de lote.



Prazo de validade (último dia do mês).



Dispositivo médico para diagnóstico in vitro.



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



Contém suficiente para "N" testes.



Atenção, consulte as instruções de utilização.



Conteúdo.





Fabricante.

SCH mRTS037PLD_pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 37/40** SCH mRTS037PLD_pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 38/40**

reagentes para PCR em tempo real do ADN



NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA

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

Os reagentes de deteção ELITe MGB® são abrangidos por um ou mais números de patente dos EUA 6972339, 7112684, 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7582739, 7601851, 7671218, 7718374, 7723038, 7759126, 7767834, 7851606, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8569516, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529 e números de patente EP 1430147, 1687609, 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 bem como os pedidos que estejam atualmente pendentes.

As tecnologias ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® estão protegidas por patentes e aplicações pendentes.

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

MGB® Eclipse Dark Quencher®, AquaPhiluor®, ELITe MGB®, o logotipo "ELITe MGB®", ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® são marcas comerciais registadas da ELITechGroup na União Europeia.

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

QIAsymphony® é uma marca comercial registada da QIAGEN.

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

SCH mRTS037PLD pt 23/01/2024 Revisão 06 **Página 39/40**

used in association with Genius series® platforms



Ref: RTS037PLD



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

Intended use

The HHV7 ELITE MGB® Kit product is an *in vitro* diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as quantitative nucleic acids Real-Time PCR assay for the detection and the quantification of the DNA of **Human Herpes Virus 7** (HHV7), extracted from clinical specimens.

The assay is validated in association with **ELITe InGenius®** and **ELITe BeGenius®** instruments, automated and integrated systems for extraction, Real-Time PCR and results interpretation, using human specimens of whole blood and plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HHV7 infections.

The results must be interpreted in combination with all relevant clinical observations and laboratory outcomes.

Amplified sequence

	Gene	Fluorophore	Channel
Target	capsid protein gene U57	FAM	HHV7
Internal Control	IC2	AP525 (VIC)	IC

Validated matrix

> Whole blood EDTA

> Plasma EDTA

Kit content and related products

HHV7 ELITE MGB KIT RTS037PLD	HHV7 ELITe Standard STD037PLD	HHV7 - ELITe Positive Control CTR037PLD
PCR MIX X 4	10 ⁵ 10 ⁴ 10 ³ 10 ² X 2	⊕ X 1
Ready-to-use PCR Mix 4 tubes of 540 µL 96 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles	Ready-to-use 4 levels: 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 2 set of 4 tubes of 160 μ L 4 freeze-thaw cycles each set (4 separate sessions on board)	Ready-to-use PC 1 tube of 160 μL 4 reactions per kit 4 freeze-thaw cycles (4 separate sessions on board)
Maximum shelf-life: 24	months	
Storage temperature ≤ -2	20°C	

Other products required not provided in the kit

> ELITe InGenius instrument: INT030

> ELITe BeGenius instrument: INT040

> ELITe InGenius SP200 Extraction Cartridge: INT032SP200

→ ELITe InGenius PCR Cassette: INT035PCR

> ELITe InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS

> CPE - Internal Control: CTRCPE

> HHV7 ELITe Standard: STD037PLD

HHV7 - ELITe Positive Control: CTR037PLD

> ELITe InGenius Waste Box: F2102-000

> 300 μL Filter Tips Axygen: TF-350-L-R-S

1000 μL Filter Tips Tecan: 30180118

ELITe InGenius and ELITe BeGenius Protocol

>	Sample volume	200 μL	Unit of quantitative result	cp/mL
>	CPE Internal Control volume	10 μL	> Frequency of controls	15 days
>	Total eluate volume	100 μL	> Frequency of calibration	60 days
>	PCR eluate input volume	10 μL		
>	HHV7 O-PCR Mix volume	20 iil		

ELITe InGenius and ELITe BeGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	500 cp/mL	100% 34/34*	100% 38/38*
Plasma	500 cp/mL	100% 33/33*	100% 33/33*

*confirmed samples/ tested samples

3

Sample preparation

This product is intended for use on the **ELITe InGenius®** and **ELITe BeGenius®** with the following clinical specimens identified according to laboratory guidelines, and collected, transported, and stored under the following conditions.

	Transport/Storage conditions			
Sample type	+16 / +26 °C (room temperature)	+2 / +8 °C	-20 ±10 °C	-70 ±15 °C
Whole Blood collected in EDTA	≤ 24 hours	≤ 72 hours	≤ 1 month	> 1 month
Plasma collected in EDTA	≤ 24 hours	≤ 72 hours	≤ 1 month	> 1 month

Do not use Plasma collected in heparin to prevent inhibition of amplification reaction and frequent invalid results.

ELITe InGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface of ELITe InGenius software to setup the run. All the steps: extraction, Real-Time PCR and result interpretation are automatically performed. Two operational mode are available: complete run (Extract + PCR) or PCR only.

Before analysis

 Switch on ELITe InGenius. Log in with username and password. Select the mode "CLOSED". 	 Verify calibrators: HHV7 Q-PCR Standard in the "Calibration menu" Verify controls: HHV7 Positive Control and HHV7 Negative Control in the "Control menu" Note: All must have been run, approved 	3. Thaw the HHV7 PCR Mix and the CTRCPE tubes Vortex gently Spin down 5 sec.
	and not expired	

Procedure 1 - Complete run: Extract + PCR (e.g., samples)

1. Select "Perform Run" on the touch screen	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 μ L", elution: "100 μ L"	3. Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID
4. Select the "Assay protocol" of interest: HHV7 ELITe_PL_200_100 or HHV7 ELITe_WB_200_100	5. Select the method "Extract + PCR" and the sample position: Primary tube or Extraction Tube	6. Load the PCR Mix and Internal Control in the Inventory Block
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tips, Extraction Tube racks and primary sample racks	8. Close the door Start the run	9. View, approve and store the results

Note: If an Extract Only mode is needed, refer to the instrument user's manual for procedure.

Procedure 2 - PCR only (e.g., eluates, standards, controls)

	1 Select "Perform Run" on the touch screen	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 μL", elution: "100 μL"	 Scan the sample barcodes with hand-barcode reader or type the sample ID
4	 Select the "Assay protocol" of interest: HHV7 ELITe_PC and HHV7 ELITe_NC or HHV7 ELITe_STD) 	5. Select the method "PCR only" andset the sample position "Elution tube"	6. Load the PCR Mix in the inventory block
	7. Load: PCR cassette rack and the Elution tube rack with the extracted nucleic acid	8. Close the door Start the run	9. View, approve and store the results

ELITe BeGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the Graphic User Interface of ELITe BeGenius software to setup the run. All the steps: extraction, Real-Time PCR and result interpretation are automatically performed. Two operational mode are available: complete run (Extract + PCR) or PCR Only.

Before analysis

- Switch on ELITe BeGenius. Log in with username and password. Select the mode "CLOSED".
- 2. Verify calibrators: HHV7 Q-PCR Standard in the "Calibration" menu. controls: HHV7 Positive Control and HHV7 Negative Control in the "Controls" menu. Note: All must have been run, approved and not expired.
- 3. Thaw the HHV7 PCR Mix and the CTRCPE tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec.

Procedure 1 - Complete run: Extract + PCR (e.g., samples)

- 1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «Extract + PCR»
- 2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the Cooler Unit. The barcode scan is already active
- 3. Verify the extraction volumes: Input: "200 μL", Elution: "100 μL"

- 4. Select the "Assay protocol" of interest (HHV7 ELITe_Be_PL_200_100 or HHV7 ELITe_Be_WB_200_100)
- Note: if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4
- 7 Load "PCR Basket" with "PCR Cassette" and the "Extraction Basket" with the "ELITe InGenius SP 200" extraction cartridges and the required extraction consumables
- Rack and insert it in the Cooler Unit
- 8. Close the door. Start the run
- 5. Print the labels to barcode the empty 6. Load the PCR-Mix and the Internal Control elution tubes. Load the tubes in the Elution in Reagent Rack/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit
 - 9. View, approve and store the results

Procedure 2 - PCR only (e.g., eluates, standards, controls)

- 1. Select "Perform Run" on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»
- 4Select the "Assay protocol" of interest (HHV7 ELITe Be PC and HHV7 ELITe_Be_NC or HHV7 ELITe_Be_STD)
- Close the door. Start the run

- 2. Load the extracted nucleic acid or controls or standards barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the Cooler Unit
- 5. Load the PCR-Mix in Reagent/ Elution Rack and insert it in the Cooler Unit
- View, approve and store the results

3. Verify the extraction volumes:

Input: "200 μL", Eluate: "100 μL"

6. Load "PCR Basket" with "PCR Cassette"