



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 19/01/2022

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«HHV8 ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTS038PLD

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

- *Update for the use of the product in association with «ELITe BeGenius[®]» instrument (REF INT040).*
- *Update of PERFORMANCE CHARACTERISTICS (pag.20):*
 - *Change in Limit of Detection (LoD)*
 - *Addition of Linear measuring range*
 - *Addition of Repeatability*
 - *Addition of Reproducibility*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE



LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT



THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT



CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT



LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT



A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT



DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT



HHV8 ELITE MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS038PLD



ÍNDICE

UTILIZAÇÃO PREVISTA	página 1
PRINCÍPIOS DO ENSAIO	página 2
DESCRIÇÃO DO PRODUTO	página 3
MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO	página 3
MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO	página 3
OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS	página 3
AVISOS E PRECAUÇÕES	página 5
ELITE INGENIUS	página 6
AMOSTRAS E CONTROLO	página 6
PROCEDIMENTO DO ELITE INGENIUS	página 7
ELITE BEGENIUS	página 14
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 14
PROCEDIMENTO DO ELITE BEGENIUS	página 16
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DO ELITE INGENIUS E ELITE BEGENIUS	página 20
OUTROS SISTEMAS	página 28
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 28
PROCEDIMENTO	página 30
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DO ELITE INGENIUS E ELITE BEGENIUS	página 38
REFERÊNCIAS	página 42
LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	página 42
RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	página 43
SÍMBOLOS	página 46
NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	página 47

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto «HHV8 ELITE MGB® Kit» faz parte de um ensaio qualitativo e quantitativo da amplificação de ácidos nucleicos para a **deteção e quantificação do ADN do vírus humano herpes 8 (HHV8)** em amostras de ADN extraídas do líquido cefalorraquidiano (LCR), sangue completo colhido em EDTA e plasma colhido em EDTA.

HHV8 ELITE MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS038PLD

O produto destina-se para utilização no diagnóstico e monitorização de infeções de HHV8, junto com dados clínicos do doente e outros resultados de testes de laboratório.

PRINCÍPIOS DO ENSAIO

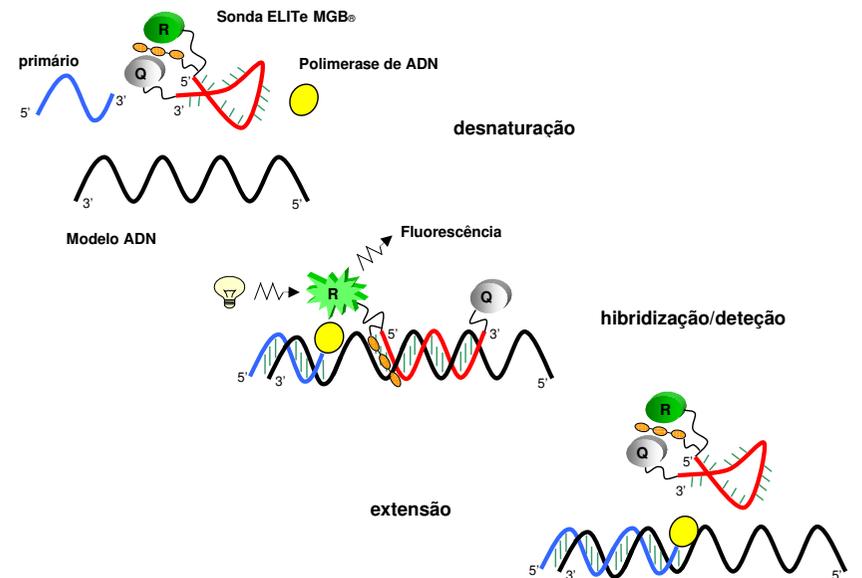
O ensaio consiste numa reação de amplificação em tempo real com um termóstato programável fornecido com um sistema ótico de deteção de fluorescência.

Em cada furo, são realizadas duas reações de amplificação a partir do ADN extraído das amostras a serem testadas: uma reação específica para uma região do gene **proteína do capsídeo menor** de (ORF26) de HHV8 e uma reação específica para uma região do gene **beta Globin** humano (Controlo Interno da inibição). A sonda específica do HHV8 com tecnologia ELITE MGB® etiquetada com fluoróforo FAM, é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação do HHV8. A sonda específica do Controlo Interno com tecnologia ELITE MGB®, etiquetada com fluoróforo AP525 (semelhante a VCI), é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação do Controlo Interno. À medida que o produto específico da reação de amplificação aumenta, a emissão de fluorescência aumenta e é medida e registada pelo instrumento. O processamento dos dados permite detetar a presença e o título do ADN de HHV8 na amostra inicial.

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

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

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



DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto «**HHV8 ELITE MGB® Kit**» fornece a mistura completa **pronta a usar** HHV8 Q - PCR Mix para amplificação em tempo real numa solução de estabilização, **aliquotada em quatro tubos de teste descartáveis**. Cada tubo contém **540 µL** de solução, suficiente para **24 testes** em associação com o «**ELITE InGenius®**» e «**ELITE BeGenius®**» e **25 testes** em associação com outros sistemas.

Os primários e a sonda específica do HHV8 (estabilizado pelo grupo MGB®, etiquetado com fluoróforo FAM e extinto por uma molécula não fluorescente) são específicos para uma região do gene da **proteína do capsídeo menor** do HHV8.

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

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

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

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

MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
HHV8 Q - PCR Mix	mistura de reação completa	4 x 540 µL	-

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

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

OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

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

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

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

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

- para os calibradores «**HHV8 ELITE STD**»,
- para o Positive Control da amplificação «**HHV8 ELITE_PC**»,
- para o Negative Control da amplificação «**HHV8 ELITE_NC**»,
- para análise de amostras «**HHV8 ELITE_WB_200_100**» e «**HHV8 ELITE_PL_200_100**».

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

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

- para os calibradores «**HHV8 ELITE_Be_STD**»,
- para o Positive Control da amplificação «**HHV8 ELITE_Be_PC**»,
- para o Negative Control da amplificação «**HHV8 ELITE_Be_NC**»,
- para análise de amostras «**HHV8 ELITE_Be_WB_200_100**» e «**HHV8 ELITE_Be_PL_200_100**».

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

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

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

Para extração automática do ADN de amostras para análise, é também validada a utilização do produto «**QIASymphony® DNA Mini Kit**» (QIAGEN GmbH, ref. 931236), kit para extração de ácido nucleico de amostras biológicas, com o instrumento «**QIASymphony® SP/AS**» (QIAGEN GmbH, ref. 9001297, 9001301) e produtos genéricos relacionados.

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

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

HHV8 ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS038PLD

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

Se for necessária a detecção de ADN de HHV8 para análise qualitativa, é necessário usar o produto «**HHV8 - ELITe Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR038PLD), controlo positivo do ADN de plasmídeo.

Se for necessária a detecção e quantificação de ADN de HHV8 (análise quantitativa), é necessário usar o produto «**HHV8 ELITe Standard**» (ELITechGroup S.p.A., ref. STD038PLD), quatro diluições de ADN de plasmídeo de quantidade conhecida para obter a curva standard.

AVISOS E PRECAUÇÕES

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

Avisos e precauções gerais

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

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

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

Nunca deve pipetar soluções com a boca.

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

Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.

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

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

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

Não utilize o produto após a data de validade indicada.

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

Não use reagentes de lotes diferentes.

Não use reagentes de outros fabricantes.

Avisos e precauções para biologia molecular

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

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

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

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

Os reagentes devem ser manuseados sob um exaustor de fluxo de ar laminar. Os reagentes necessários para a amplificação devem ser preparados de forma a que possam ser usados numa sessão única. As pipetas usadas no manuseamento dos reagentes devem ser usadas exclusivamente para este

HHV8 ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS038PLD

fim. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

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

Avisos e precauções específicos para os componentes

A **HHV8 Q - PCR Mix** deve ser guardada a -20° C num local escuro.

A **HHV8 Q - PCR Mix** pode ser congelada e descongelada para um máximo de **cinco sessões**: quaisquer ciclos de congelação/descongelação adicionais podem causar um menor desempenho do produto.

A **HHV8 Q - PCR Mix** pode ser utilizada para 5 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 3 sessões de trabalho consecutivas de 3 horas cada. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

ELITe InGenius®

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

O produto deve ser utilizado com as seguintes amostras clínicas:

Sangue completo colhido em EDTA

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

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

Nota: quando a extração de ADN de sangue completo for realizada com o **ELITe InGenius** e com o **ELITe InGenius Software** versão 1.3 (ou versões equivalentes mais recentes), use os protocolos de extração **HHV8 ELITe_WB_200_100**. Este protocolo processa 200 µL de amostra, adiciona o **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

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

Plasma colhido em EDTA

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

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

Nota: quando a extração de ADN de plasma for realizada com o **ELITe InGenius** e com o **ELITe InGenius Software** versão 1.3 (ou versões equivalentes mais recentes), use os protocolos de extração **HHV8 ELITe_PL_200_100**. Este protocolo processa 200 µL de amostra, adiciona o **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

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

Outras amostras:

Não existem dados disponíveis relativos aos desempenhos do produto com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: líquido cefalorraquidiano e biopsias cutâneas.

Substâncias interferentes

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

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

Calibradores da amplificação e controlos da amplificação

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

como definição do calibrador, utilize os quatro níveis de concentração do **HHV8 ELITE Standard**, em associação com o protocolo «**HHV8 ELITE STD**» para o **ELITE InGenius** como Controlo positivo da amplificação use o **HHV8 - ELITE Positive Control**, em associação com o protocolo «**HHV8 ELITE_PC**» para o **ELITE InGenius**, como Controlo negativo da amplificação, use água de qualidade molecular (não fornecida com este kit) em associação com o protocolo «**HHV8 ELITE_NC**» para o **ELITE InGenius**.

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

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

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

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

Controlos da qualidade

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

PROCEDIMENTO do ELITE InGenius

O procedimento para utilização do «**HHV8 - ELITE MGB® Kit**» com o sistema **ELITE InGenius** consiste em três passos:

- Verificação da prontidão do sistema,
- Preparação da sessão,
- Revisão e exportação de resultados.

Verificação da prontidão do sistema

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

- ligar o **ELITE InGenius** e selecionar o modo de início de sessão «**CLOSED**» (Fechado);
- certificar-se de que os Calibradores (**HHV8 Q-PCR Standard**) foram executados, aprovados e não estão expirados (Estado) em associação com o lote do reagente de amplificação a ser usado. Pode verificar esta situação no menu «Calibração» na página inicial. Se não existirem Calibradores aprovados ou válidos, execute-os como descrito nos parágrafos seguintes,
- certificar-se de que os controlos da amplificação (**HHV8 - Positive Control, HHV8 Negative Control**) foram executados, aprovados e não estão expirados (Estado) em associação com o lote do reagente de amplificação a ser usado. Pode verificar esta situação no menu «Controlo» na página

inicial. Se não existirem controlos da amplificação aprovados ou válidos, execute-os como descrito nos parágrafos seguintes,

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

Os Protocolos de ensaio disponíveis para o «**HHV8 ELITE MGB® Kit**» estão descritos na tabela seguinte.

Protocolos de ensaio para o «Kit HHV8 ELITE MGB®»			
Nome	Matriz	Unidade do relatório	Características
HHV8 ELITE_WB_200_100	Sangue completo	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo interno: 10 µL Sonicação: NÃO Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada PCR de amostra: 20 µL
HHV8 ELITE_PL_200_100	Plasma	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo interno: 10 µL Sonicação: NÃO Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada PCR de amostra: 20 µL

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

Os protocolos para análise qualitativa estão disponíveis a pedido.

Preparação da sessão

O produto **HHV8 ELITE MGB® Kit** pode ser usado com o sistema **ELITE InGenius** para realizar:

- Execução integrada (Extract + PCR),
- Execução de amplificação (PCR only),
- Execução da calibração (PCR only),
- Execução de amplificação para execução de Positive e Negative Control (PCR only).

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

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

Estão descritos nos parágrafos seguintes os passos principais para a preparação dos três tipos de execução.

A. Execução integrada

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

- Descongele os tubos da **HHV8 Q - PCR Mix** à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos em número suficiente para a sessão. Cada tubo é suficiente para 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Descongele o **HHV8 Q - PCR Mix** num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

- Descongele os tubos **CPE** à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos para a sessão. Cada tubo é suficiente para 12 extrações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo

- durante 5 segundos.
3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
 4. Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" é de 100 µL.
 5. Para cada Rastreo de interesse preencha a "SampleID" (SID) digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
 6. Selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (por ex., HHV8 ELITe_PL_200_100).
 7. Certifique-se de que o "Protocol" apresentado é: "Extract + PCR".
 8. Selecione a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position":
se for usado um tubo primário, selecione "Tubo primário",
se for usado um tubo secundário, selecione "Extraction Tube".
Clique em "Next" para continuar a preparação.
 9. Carregue a CPE e a Mistura HHV8 Q-PCR no "Bloco de inventário" selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
 10. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
 11. Carregue as "PCR Cassettes", os cartuchos de extração "ELITe InGenius SP 200", todos os consumíveis necessários e as amostras a serem extraídas, seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
 12. Feche a porta do instrumento.
 13. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

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

B. Execução da amplificação

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

1. Descongele um número suficiente de tubos da HHV8 Q - PCR Mix à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos para a sessão. Cada tubo é suficiente para 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Nota:** Descongele o **HHV8 Q - PCR Mix** num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.
2. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
 3. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o Extraction Input Volume é de 200 µL e que o Extracted Elute Volume é de 100 µL.
 4. Para cada Rastreo de interesse preencha a SID digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
 5. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (por ex., HHV8 ELITe_PL_200_100).
 6. Selecione "PCR Only" na coluna "Protocol".

7. Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" é "Elution Tube (fila inferior)". Clique em "Next" para continuar a preparação.
8. Carregue a **HHV8 Q-PCR Mix** no "Inventory Block" selecionado seguindo as instruções da GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue as "PCR Cassettes" e as amostras de Ácido nucleico extraídas seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
11. Feche a porta do instrumento.
12. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

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

C. Execução de calibração

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

1. Descongele os tubos da **HHV8 Q - PCR Mix** à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos em número suficiente para a sessão. Cada tubo é suficiente para 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Descongele o **HHV8 Q - PCR Mix** num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

2. Descongele os tubos **HHV8 Q-PCR Standard** (Cal1: HHV8 Q-PCR Standards 10², Cal2: HHV8 Q-PCR Standards 10³, Cal3: HHV8 Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: HHV8 Q-PCR Standards 10⁵) à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
4. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Extraction Input Volume" é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" é de 100 µL.
5. No Rastreo de interesse, selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay".
6. Selecione o Protocolo do ensaio "HHV8 ELITe_STD" na coluna "Ensaio" e preencha o número do lote e a data de validade do HBV Q-PCR Standard.
7. Clique em "Next" para continuar a preparação.
8. Carregue a HHV8 Q-PCR Mix no Inventory Block selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue as "PCR Cassettes", os tubos **HHV8 Q-PCR Standard** seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
11. Feche a porta do instrumento.
12. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o sistema ELITE InGenius permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

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

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

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

D. Execução de amplificação para Positive Control e Negative Control

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

1. Descongele um número suficiente de tubos da **HHV8 Q - PCR Mix** à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos para a sessão. Cada tubo é suficiente para 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Descongele o **HHV8 Q - PCR Mix** num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

2. Descongele os tubos de **HHV8 - Positive Control** à temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos para a sessão de amplificação do controlo positivo. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Transfira pelo menos 50 µL da água de qualidade para biologia molecular para as sessões num tubo Eluição, fornecido com o ELITE InGenius SP Consumable Set.
4. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
5. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Volume de entrada de extração" é de 200 µL e que o "Volume de eluição extraído" é de 50 µL.
6. No Rastreo de interesse, selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay".
7. Para o positivo control, selecione o Protocolo de ensaio "HHV8 ELITE_PC" na coluna "Assay" e preencha o número do lote e a data de validade do HHV8 Positive Control.
8. Para o controlo negativo, selecione o Protocolo de ensaio "HHV8 ELITE_NC" e preencha o número do lote e a data de validade da água de qualidade para biologia molecular.
9. Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue a **HHV8 Q-PCR Mix** no "Inventory Block" selecionado seguindo as instruções da GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue/verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
12. Carregue as "PCR Cassettes", o tubo Controlo positivo HHV8 e o tubo de controlo negativo seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
13. Feche a porta do instrumento.
14. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o **ELITE InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

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

Nota: No final da execução o restante Controlo positivo pode ser removido do instrumento, tapado e

guardado a -20 °C. O restante controlo negativo deve ser eliminado.

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

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

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

Revisão e aprovação de resultados

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

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

O **ELITE InGenius** gera os resultados utilizando o produto «**HHV8 ELITE MGB® Kit**» através do seguinte procedimento:

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

A. Validação da Curva de calibração

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda HHV8 específica ("HHV8") nas reações de amplificação do Calibrador são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos no protocolo de ensaio "HHV8 ELITE_STD".

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

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

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

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

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

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda específica HHV8 ("HHV8") na sonda de controlo interno específica ("CI") e nas reações de amplificação de Controlo positivo e Controlo negativo são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos nos protocolos de ensaio "HHV8 ELITE_PC" e "HHV8 ELITE_NC".

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

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

Antes de analisar qualquer amostra, é absolutamente obrigatório certificar-se de que o Controlo positivo e Controlo negativo da amplificação foram executados com o lote do reagente de amplificação a ser

usado e que os resultados estão aprovados e válidos. A disponibilidade de resultados do Controlo positivo e Controlo negativo da amplificação "Aprovados" (Estado) é mostrada na janela "Controlos" da GUI. Se os resultados da amplificação de Controlo positivo e Controlo negativo estiverem em falta, crie os mesmos da forma acima descrita.

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

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

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

C. Validação dos resultados das amostras

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda HHV8 específica ("HHV8") e pela sonda de Controlo Interno específica ("CI") em cada reação de amplificação da amostra são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos no protocolo de ensaio.

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

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

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

1) Curva de calibração	Estado
HHV8 Q-PCR Standard	APROVADO
2) Positive Control	Estado
HHV8 Positive Control	APROVADO
3) Negative Control	Estado
HHV8 Negative Control	APROVADO

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

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

Resultado da execução da amostra	Interpretação
HHV8: ADN detetado, quantidade igual a XXX cópias/mL	ADN HHV8 detetado no intervalo de medição do ensaio, quantidade como mostrado.
HHV8: ADN detetado, quantidade inferior a LLoQ cópias/mL	ADN HHV8 detetado abaixo do limite inferior de quantificação do ensaio
HHV8: ADN detetado, quantidade além de ULoQ cópias/mL	ADN HHV8 detetado além do limite superior de quantificação do ensaio
HHV8: ADN não detetado ou inferior a LoD cópias/mL	ADN HHV8 não detetado ou abaixo do limite de deteção do ensaio.
Inválido - Voltar a testar a amostra	Resultado da amostra não válido devido a falha do Controlo Interno (Extração incorreta ou transferência do inibidor).

As amostras não adequadas para interpretação dos resultados são reportadas como "Inválido - Voltar a testar a amostra" pelo **ELITE InGenius Software**. Neste caso, o ADN do Controlo Interno não foi

detetado eficientemente devido a problemas no passo de amplificação ou extração (degradação do ADN, perda de ADN durante a extração ou transferência de inibidores na eluição), que pode resultar em falsos negativos.

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

As amostras adequadas para análise mas em que não foi possível detetar ADN de HHV8 são reportadas como: "ADN não detetado ou inferior ao LoD". Neste caso não pode excluir-se que o ADN de HHV8 está presente a uma concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver "Características de desempenho").

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

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

D. Elaboração do relatório do resultado das amostras

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

O "Sample Report" apresenta os detalhes de uma execução da amostra ordenada pela ID da amostra, ou seja, por paciente.

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

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

ELITE BeGenius®

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

O produto deve ser utilizado com as seguintes amostras clínicas:

Sangue completo colhido em EDTA

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

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

Nota: quando a extração de ADN do sangue completo é realizada com o **ELITE BeGenius** e com o **ELITE BeGenius Software** versão **2.0.0** (ou versões equivalentes posteriores), use o protocolo de extração **HHV8 ELITE_Be_WB_200_100** Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o **CPE Internal Control** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

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

Plasma colhido em EDTA

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

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

Nota: quando a extração de ADN do sangue completo é realizada com o **ELITe BeGenius** e com o **ELITe BeGenius Software** versão **2.0.0** (ou versões equivalentes posteriores), use o protocolo de extração **HHV8 ELITe_Be_PL_200_100** Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o **CPE Internal Control** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

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

Outras amostras:

Não existem dados disponíveis relativos aos desempenhos do produto com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: líquido cefalorraquidiano e biopsias cutâneas.

Substâncias interferentes

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

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

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

Calibradores da amplificação e controlos da amplificação

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

como definição do calibrador, utilize os quatro níveis de concentração do **HHV8 ELITe Standard**, em associação com o protocolo «**HHV8 ELITe_Be_STD**» para o **ELITe BeGenius**, como Controlo positivo da amplificação use o **HHV8 - ELITe Positive Control**, em associação com o protocolo «**HHV8 ELITe_Be_PC**» para o **ELITe BeGenius**, como Controlo negativo da amplificação, use água de qualidade molecular (não fornecida com este kit) em associação com o protocolo «**HHV8 ELITe_Be_NC**» para o **ELITe BeGenius**,

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

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

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

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

Controlos da qualidade

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

PROCEDIMENTO do ELITe BeGenius

O procedimento para utilização do «**HHV8 ELITe MGB Kit**» com o sistema **ELITe BeGenius** consiste em três passos:

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

Verificação da prontidão do sistema

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

- ligar o **ELITe BeGenius** e selecionar o modo "CLOSED" (Fechado).
- verificar se os Calibradores (**HHV8 Q-PCR Standard**) foram executados, aprovados e não estão expirados (estado). Pode verificar esta situação no menu "Calibração" na página inicial;
- verificar se os controlos da amplificação (**HHV8 - Positive Control**, **HHV8 Negative Control**) foram executados, aprovados e não estão expirados (estado). Pode verificar esta situação no menu "Controlo" na página inicial;
- escolher o tipo de execução e preparar a mesma, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pelo ELITechGroup. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os kits **ELITe MGB**, matrizes e o instrumento **ELITe BeGenius**.

Os Protocolos de ensaio disponíveis para o «**HHV8 ELITe MGB® Kit**» estão descritos na tabela seguinte.

Protocolos de ensaio para o «HHV8 ELITe MGB Kit» e o ELITe InGenius			
Nome	Matriz	Unidade do relatório	Características
HHV8 ELITe_Be_WB_200_100	Sangue completo	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo interno: 10 µL Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada PCR de amostra: 20 µL
HHV8 ELITe_Be_PL_200_100	Plasma	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Controlo interno: 10 µL Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada PCR de amostra: 20 µL

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

Preparação da sessão

O **HHV8 ELITe MGB Kit** em associação com o **ELITe BeGenius** pode ser usado para:

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

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

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

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

A. Execução da amostra

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

1. Descongele um número suficiente de tubos da HHV8 Q - PCR Mix para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Descongele um número suficiente de tubos CPE para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para 12 extrações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
4. Retire os Suportes da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
5. Selecione o "run mode": "Extract + PCR".
6. Carregue as amostras nos Racks 5 e 4 (comece sempre com o Rack 5).
7. Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.

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

8. Verifique o Volume de entrada de extração (200 µL) e o Volume de eluição extraído (100 µL).
9. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (isto é, HHV8 ELITe_Be_WB_200_100). Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Se usado, repita os passos 7 a 9 para o Rack 4.
11. Carregue os tubos de eluato nos Racks 3 e 2 (comece sempre com o Rack 3).

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

12. Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
13. Se usado, repita o passo 12 para o Rack 2.
14. Carregue o CPE e a HHV8 Q-PCR Mix no Rack 1.
15. Insira o Rack 1 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
16. Carregue e verifique os Suportes de pontas na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
17. Carregue o Cesto com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
18. Carregue o Cesto com os cartuchos de extração "ELITe InGenius SP 200" e os consumíveis de extração necessários seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
19. Feche a porta do instrumento.
20. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

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

B. Execução da amplificação

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

1. Descongele um número suficiente de tubos da HHV8 Q - PCR Mix para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Descongele um número suficiente de tubos CPE para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para 12 extrações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
4. Retire os Suportes 1, 2 e 3 da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
5. Selecione o "run mode": "PCR Only".
6. Carregue as amostras nos Racks 3 e 2 (comece sempre com o Rack 3).
7. Insira o suporte na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
8. Mesmo que não seja efetuada a extração, verifique o Volume de entrada de extração (200 µL) e o Volume de eluição extraído (100 µL).
9. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (por ex., HHV8 ELITe_Be_WB_200_100). Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Repita os passos 7 a 9 para o Rack 2.
11. Carregue o CPE e a HHV8 Q-PCR Mix no Rack 1.
12. Insira o Rack 1 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
13. Carregue e verifique os Suportes de pontas na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
14. Carregue o Cesto com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
15. Feche a porta do instrumento.
16. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

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

C. Execução de calibração

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

1. Descongele um número suficiente de tubos da HHV8 Q - PCR Mix para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Descongele os tubos HHV8 Q - PCR Standard (Cal1: HHV8 Q-PCR Standards 10², Cal2: HHV8 Q-PCR Standards 10³, Cal3: HHV8 Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: HHV8 Q-PCR Standards 10⁵). Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".

4. Retire os Suportes 1, 2 e 3 da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
5. Selecione o "run mode": "PCR Only".
6. Carregue os tubos do Calibrador nos Racks 3.
7. Selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (HHV8 ELITe_Be_STD). Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
8. Carregue a HHV8 Q-PCR Mix no Rack 2.
9. Insira o Rack 2 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue e verifique os Suportes de pontas na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue o Cesto com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
12. Feche a porta do instrumento.
13. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

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

D. Execução de Controlo positivo e Controlo negativo

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

1. Descongele um número suficiente de tubos da HHV8 Q - PCR Mix para a sessão. Cada novo tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Descongele o produto HHV8 - ELITe Positive Control, para amplificação de Positive Control. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Transfira pelo menos 50 µL da água de qualidade para biologia molecular (como Negative Control) para as sessões num tubo Eluição, fornecido com o ELITe InGenius SP Consumable Set.
4. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
5. Retire os Suportes 1, 2 e 3 da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
6. Selecione o "run mode": "PCR Only".
7. Carregue os tubos de Positive Control e Negative Control nos Racks 3.
8. Selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (por ex., (HHV8 ELITe_Be_PC e HHV8 ELITe_Be_NC). Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue a HHV8 Q-PCR Mix no Rack 2.
10. Insira o Rack 2 na "Cooler Unit". Clique em "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue e verifique os Suportes de pontas na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
12. Carregue o Cesto com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.

13. Feche a porta do instrumento.
14. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

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

Revisão e aprovação de resultados

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

O ELITe BeGenius gera os resultados utilizando o HHV8 ELITe MGB Kit através do seguinte procedimento:

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

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

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO do ELITe InGenius e ELITe BeGenius

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

O LoD deste ensaio foi testado usando o ADN de plasmídeo que contém o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. O ADN de plasmídeo foi diluído a um título de cerca de 10 cópias / 20 µL na presença de ADN de plasmídeo contendo o controlo interno a um título de 150.000 cópias / 20 µL. Esta amostra foi testada em 18 réplicas (modo de "PCR Only") a realizarem a amplificação por produtos ELITechGroup S.p.A. em dois instrumentos diferentes.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
10 cópias de ADN de plasmídeo HHV8+ 150.000 cópias de controlo interno	18	18	0

O Limite de deteção (LoD) do HHV8 ELITe MGB® Kit foi verificado em associação com amostras de **Sangue completo** e **Plasma** colhidas em EDTA e nos sistemas **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius**.

Para sangue completo:

O LoD deste ensaio foi verificado através de testes a 20 réplicas de amostras de sangue completo reforçadas com 117 cópias/mL nos sistemas **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** no modo "Extract + PCR". As amostras foram reforçadas com material de referência Human Herpes Virus Type 8 (HHV-8) Infectious Culture Fluid (ZeptoMetrix Corporation).

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

Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de detecção para amostras de sangue completo e ELITE InGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
Sangue completo colhido em EDTA	117 cópias/mL	20	20	20	0

Limite de detecção para amostras de sangue completo e ELITE InGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
Sangue completo colhido em EDTA	117 cópias/mL	20	20	20	0

O valor de LoD para o alvo HHV8 foi confirmado a 117 IU/mL para sangue completo colhido em EDTA.

Para Plasma:

O LoD deste ensaio foi verificado através de testes a 20 réplicas de amostras de plasma reforçadas com 98 cópias/mL nos sistemas **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** no modo "Extract + PCR". As amostras foram reforçadas com material de referência Human Herpes Virus Type 8 (HHV-8) Infectious Culture Fluid (ZeptoMetrix Corporation).

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

Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.

Limite de detecção para amostras de plasma e ELITE InGenius					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
Plasma colhido em EDTA	98 cópias/mL	20	20	20	0

Limite de detecção para amostras de plasma e ELITE BeGenius®					
Amostra	LoD	N	Válido	Positivo	Negativo
Plasma colhido em EDTA	98 cópias/mL	20	20	20	0

O valor de LoD para o alvo HHV8 foi confirmado a 98 IU/mL para plasma colhido em EDTA.

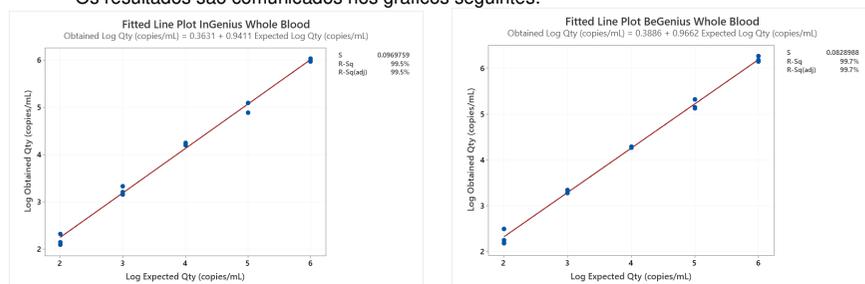
Intervalo de medição linear e Limites de quantificação

O intervalo de medição linear do HHV8 ELITE MGB® Kit usado em associação com **Sangue completo** e **Plasma** colhido em EDTA e os **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** foi verificado com um painel de diluições de HHV8. O painel foi preparado através da diluição de Human Herpes Virus Type 8 (HHV-8) Infectious Culture Fluid (ZeptoMetrix Corporation) em matrizes negativas para ADN de HHV8. O painel era constituído por cinco pontos de diluição a partir de 1×10^6 cópias/mL a 2×10^2 cópias/mL. Cada amostra do painel foi testada em 3 réplicas.

Para sangue completo:

A análise dos dados obtidos, realizada por análise da regressão linear, demonstrou que o ensaio, em associação com amostras de sangue completo, mostra uma resposta linear para todas as diluições com um coeficiente de correlação quadrado (R²) igual a 0,995 para o **ELITE InGenius** e 0,997 para o **ELITE BeGenius**.

Os resultados são comunicados nos gráficos seguintes.



O Limite inferior de quantificação (LLOq) foi definido à concentração do LoD que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,1839 Registo cópias/mL para o **ELITE InGenius** e 0,3488 Registo cópias/mL para o **ELITE BeGenius**) e exatos (Bias igual a 0,0014 Registo cópias/mL para o **ELITE InGenius** e 0,1329 Registo cópias/mL para o **ELITE BeGenius**): 117 cópias/mL.

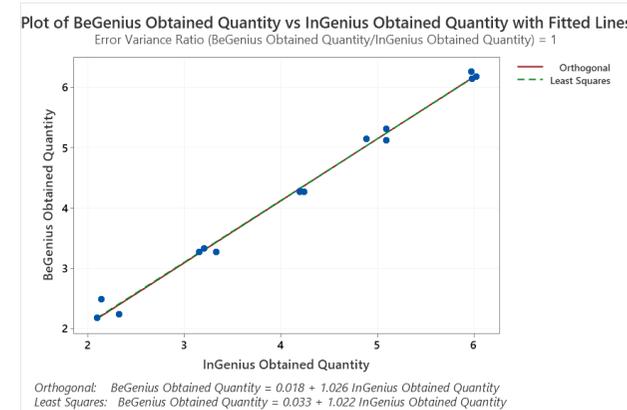
O Limite superior de quantificação (ULOq) foi definido à concentração mais alta testada que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,0302 Registo cópias/mL para o **ELITE InGenius** e 0,06107 Registo cópias/mL para o **ELITE BeGenius**) e exatos (Bias igual a 0,0078 Registo cópias/mL para o **ELITE InGenius** e -0,1914 Registo cópias/mL para o **ELITE BeGenius**): 1.000.000 cópias/mL.

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear para amostras de sangue completo e o ELITE InGenius® e ELITE BeGenius®		
Unidade de medida	limite inferior	limite superior
cópias/mL	117	1.000.000

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

Os resultados estão resumidos na figura seguinte.

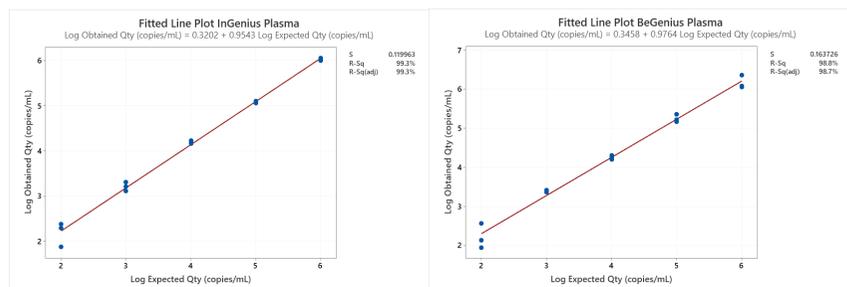


Neste teste, a análise da regressão ortogonal gerou um declive igual a 1,026 (95% CI: 0,980 - 1,072) e uma interceção igual a 0,018 (95% CI: - 0,183; 0,219). A análise de regressão linear gerou um R² de 0,993.

Para Plasma:

A análise dos dados obtidos, realizada por análise da regressão linear, demonstrou que o ensaio, em associação com amostras de sangue completo, mostra uma resposta linear para todas as diluições com um coeficiente de correlação quadrado (R²) igual a 0,993 para o **ELITE InGenius** e 0,988 para o **ELITE BeGenius**.

Os resultados são comunicados nos gráficos seguintes.



O Limite inferior de quantificação (LLOQ) foi definido à concentração do LoD que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,1971 Registo cópias/mL para o **ELITE InGenius** e 0,090 Registo cópias/mL para o **ELITE BeGenius**) e exatos (Bias igual a 0,1537 Registo cópias/mL para o **ELITE InGenius** e 0,2693 Registo cópias/mL para o **ELITE BeGenius**): 98 cópias/mL.

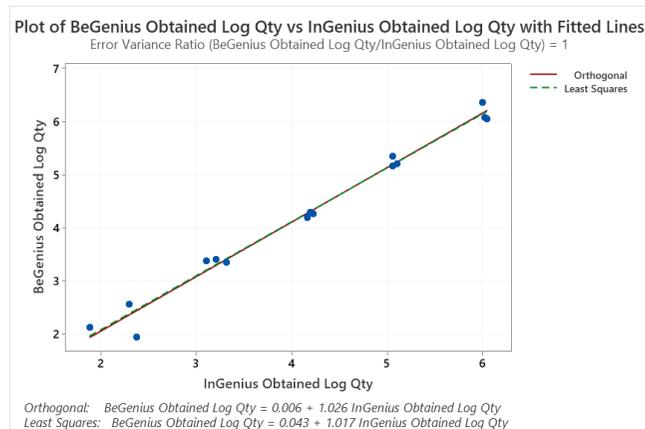
O Limite superior de quantificação (ULOQ) foi definido à concentração mais alta testada que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio padrão igual a 0,0245 Registo cópias/mL para o **ELITE InGenius** e 0,1731 Registo cópias/mL para o **ELITE BeGenius**) e exatos (Bias igual a -0,0249 Registo cópias/mL para o **ELITE InGenius** e -0,1647 Registo cópias/mL para o **ELITE BeGenius**): 1.000.000 cópias/mL.

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear para amostras de plasma e o ELITE InGenius® e ELITE BeGenius®		
Unidade de medida	limite inferior	limite superior
cópias/mL	98	1.000.000

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

Os resultados estão resumidos na figura seguinte.



Neste teste, a análise da regressão ortogonal gerou um declive igual a 1,026 (95% CI: 0,953; 1,099) e uma interceção igual a 0,006 (95% CI: - 0,312; 0,324). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0,983.

Capacidade de repetição

A Capacidade de repetição dos resultados obtidos pelo produto HHV8 ELITE MGB Kit em associação com os sistemas **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** foi testada através da análise de um painel de amostras de Sangue completo colhido em EDTA. O painel incluiu uma amostra negativa e duas amostras reforçadas com material de referência certificado de HHV8 (Human Herpes Virus Type 8 (HHV-8) Infectious Culture Fluid ZeptoMetrix) a uma concentração de 3 x LoD (cerca de 351 cópias/mL) e de 10 x LoD (cerca de 1170 cópias/mL).

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

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

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

É mostrado nas tabelas seguintes um resumo dos resultados.

Capacidade de repetição intra-sessão ELITE InGenius								
Amostra	HHV8				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	25,39	0,44	1,75
3 x LoD	8 / 8	35,66	0,39	1,10				
10 x LoD	8 / 8	33,95	0,28	0,84				

Capacidade de repetição inter-sessão ELITE InGenius								
Amostra	HHV8				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	48 / 48	25,22	0,93	3,69
3 x LoD	16 / 16	35,58	0,51	1,44				
10 x LoD	16 / 16	33,93	0,56	1,65				

No teste da Capacidade de repetição no **ELITE InGenius**, o ensaio detetou o HHV8 alvo como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores Ct que não excederam 1,65% para HHV8 e 3,69% para o Controlo Interno.

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

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

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

É mostrado nas tabelas seguintes um resumo dos resultados.

Capacidade de repetição intra-sessão ELITE BeGenius								
Amostra	HHV8				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	28,70	0,95	3,29
3 x LoD	8 / 8	36,36	0,42	1,16				
10 x LoD	8 / 8	34,43	0,11	0,31				

É mostrado na tabela seguinte um resumo dos resultados.

Capacidade de repetição inter-sessão ELITE BeGenius								
Amostra	HHV8				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	48 / 48	28,54	1,16	4,05
3 x LoD	16 / 16	36,10	0,52	1,44				
10 x LoD	16 / 16	34,25	0,32	0,93				

No teste da Capacidade de repetição no **ELITE BeGenius**, o ensaio detetou o HHV8 alvo como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores Ct que não excederam 1,44% para HHV8 e 4,05% para o Controlo Interno.

Capacidade de reprodução

A Capacidade de reprodução dos resultados obtidos pelo produto HHV8 ELITE MGB Kit em associação com os sistemas **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** foi testada através da análise de um painel de amostras de plasma. O painel incluiu uma amostra negativa e duas amostras reforçadas com material de referência certificado de HHV8 (Human Herpes Virus Type 8 (HHV-8) Infectious Culture Fluid ZeptoMetrix) a uma concentração de 3 x LoD (cerca de 351 cópias/mL) e de 10 x LoD (cerca de 1170 cópias/mL).

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

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

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

É mostrado na tabela seguinte um resumo dos resultados.

Capacidade de reprodução inter-instrumento ELITE InGenius								
Amostra	HHV8				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	24,40	1,49	6,11
3 x LoD	8 / 8	35,27	0,28	0,78				
10 x LoD	8 / 8	33,87	0,37	1,09				

Capacidade de repetição inter-lote ELITE InGenius								
Amostra	HHV8				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	25,69	1,03	3,99
3 x LoD	8 / 8	35,47	0,49	1,38				
10 x LoD	8 / 8	33,84	0,31	0,92				

No teste da Capacidade de reprodução no **ELITE InGenius**, o ensaio detetou o HHV8 alvo como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores Ct que não excederam 1,38% para HHV8 e 6,11% para o Controlo Interno.

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

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

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

Capacidade de repetição inter-instrumento ELITE BeGenius								
Amostra	HHV8				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	28,39	1,37	4,82
3 x LoD	8 / 8	36,19	0,61	1,70				
10 x LoD	8 / 8	24,24	0,42	1,22				

Capacidade de repetição inter-lote ELITE BeGenius								
Amostra	HHV8				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct média	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	28,83	1,02	3,55
3 x LoD	8 / 8	35,79	0,58	1,73				
10 x LoD	8 / 8	34,10	0,40	1,17				

No teste da Capacidade de reprodução no **ELITE BeGenius**, o ensaio detetou o HHV8 alvo como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores Ct que não excederam 1,7% para HHV8 e 4,8% para o Controlo Interno.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada através da análise de algumas amostras clínicas de sangue completo e plasma colhido em EDTA positivas para ADN de HHV8 em associação com o **ELITE InGenius**. Dado que o **ELITE BeGenius** tem desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITE InGenius**, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a sensibilidade do diagnóstico do ensaio obtido em associação com o **ELITE InGenius** também se aplica ao **ELITE BeGenius**.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 30 amostras de sangue completo colhidas em EDTA que eram negativas para ADN de HHV8 e que foram reforçadas para ADN de HHV8 adicionando HUMAN HERPES VIRUS TYPE 8 (HHV-8) Infectious Culture Fluid (ZeptoMetrix Corporation) num título de 750 cópias/mL e 30 amostras de plasma colhidas em EDTA que eram negativas para ADN de HHV8 e que foram reforçadas para ADN de HHV8 adicionando HHV8 Infectious Culture Fluid (ZeptoMetrix Corporation) a um título de 750 cópias/mL.

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

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue completo colhido em EDTA, reforçado com ADN de HHV8	30	30	0
Plasma colhido em EDTA reforçado com ADN de HHV8	30	30	0

Todas as amostras foram confirmadas positivas.

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

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi avaliada através da análise de algumas amostras clínicas de sangue completo e plasma colhidas em EDTA negativas para ADN de HHV8 em associação com o **ELITE InGenius**. Dado que o **ELITE BeGenius** tem desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITE InGenius**, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a especificidade do diagnóstico do ensaio obtido em associação com o **ELITE InGenius** também se aplica ao **ELITE BeGenius**.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 32 amostras de sangue completo colhido em EDTA a partir de dadores saudáveis que estavam presumivelmente negativos para ADN de HHV8 e 32 amostras de plasma colhido em EDTA a partir de dadores saudáveis que estavam presumivelmente negativos para ADN de HHV8.

Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração, amplificação, deteção e interpretação de resultados com o «**ELITE InGenius**» e com produtos

HHV8 ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS038PLD

ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue completo colhido em EDTA e negativo para ADN de HHV8	32	0	32
Plasma colhido em EDTA e negativo para ADN de HHV8	32	0	32

Todas as amostras foram detetadas corretamente.

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

HHV8 ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS038PLD

OUTROS SISTEMAS

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

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

Líquido cefalorraquidiano (LCR)

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

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

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.

Sangue completo colhido em EDTA

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

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

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

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

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

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

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

- opcional: adicione a fase de dissociação (Adicionar fase de dissociação) e defina a temperatura de 40 °C a 80 °C.

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

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

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

- ligar o ciclo térmico em tempo real, ligar o computador, executar o software dedicado e abrir uma sessão "quantificação absoluta", bem como definir o "Modo de execução: Rápido 7500";
- definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda HHV8 com o "dispositivo de relatório" = "FAM" e o "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) " e dar-lhe o nome "HHV8";
- definir (Gestor do detetor) o "detetor" para a sonda de controlo interno com o "dispositivo de relatório" = "VIC" (AP525 é semelhante ao VIC) e o "disposição de extinção" = "nenhum" (não fluorescente) " e dar-lhe o nome "CI";
- para cada furo em utilização na microplaca, defina (Inspetor do furo) o "detetor" (tipo de fluorescência a ser medida), a "referência passiva" = "Cy5" (é usado AP593 em vez de Cy5, para a normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (amostra, controlo de amplificação negativo, controlo de amplificação positivo ou padrão de quantidade conhecido). Adicione esta informação à **Ficha de trabalho** anexada no final deste manual ou imprima a preparação da microplaca. A **Ficha de trabalho** deve ser atentamente seguida durante a transferência da mistura de reação e das amostras para os furos.

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

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

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

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

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

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

- defina o número de ciclos para **45**;

- defina o volume para a emulação de software de transferência térmica para a reação ("Volume da amostra") para **30 µL**;

- opcional: adicione a fase de dissociação (Adicionar fase de dissociação) e defina a temperatura de **40 °C a 80 °C**.

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

Preparação da amplificação

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

Antes de iniciar a sessão, é necessário:

- descongelar os tubos que contêm as amostras a serem analisadas. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo;
- descongelar os tubos da **Mistura HHV8 Q - PCR** necessários para a sessão, sem esquecer que cada tubo é suficiente para a preparação de **25 reações**. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo;
- descongele o **HHV8 - Controlo positivo** ou os tubos **HHV8 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.

1. Com a pipeta, introduza exatamente **20 µL** da **Mistura HHV8 Q - PCR** no fundo dos furos da **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Evite a criação de bolhas.

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

2. Com a pipeta, introduza exatamente, colocando na mistura de reação, **20 µL** de **ADN extraído** da primeira amostra no furo correspondente da **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem a amostra introduzindo com a pipeta o **ADN extraído** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma com as outras amostras de **ADN extraído**.
3. Com a pipeta, introduza exatamente, colocando na mistura de reação, **20 µL** de **água de qualidade para biologia molecular** (não fornecida com este produto) no furo da **microplaca da amplificação** do controlo negativo da amplificação, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o controlo negativo introduzindo com a pipeta a **água de qualidade para biologia molecular** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.
4. Com base no resultado necessário (qualitativo ou quantitativo), deve seguir uma das destas duas opções:

- Quando for necessário um resultado **qualitativo** (deteção de ADN de HHV8): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **HHV8 - Controlo positivo** 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 20 µL três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.

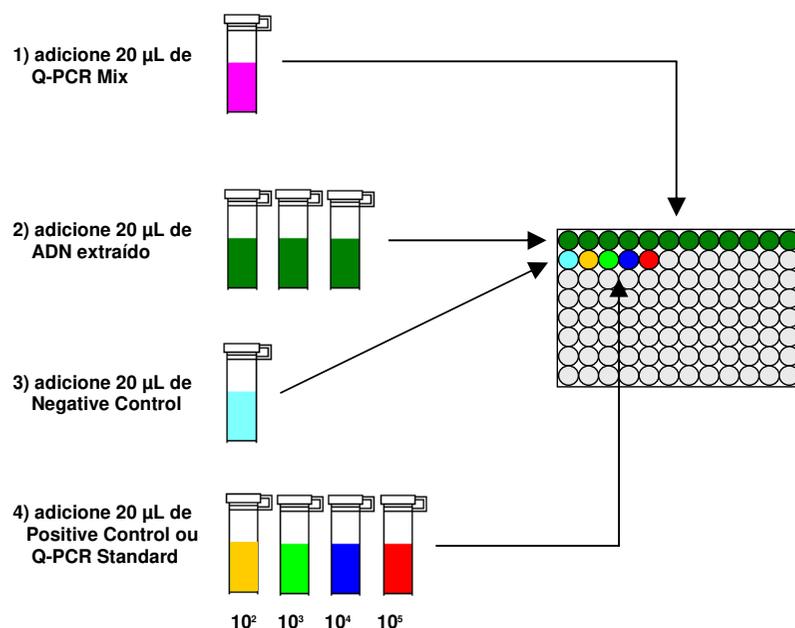
- Quando for necessário um resultado **quantitativo** (quantificação de ADN de HHV8): com a pipeta, introduza exatamente, colocando dentro da mistura de reação, **20 µL** de **HHV8 Q - PCR Standard 102** no furo correspondente na **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o standard introduzindo com a pipeta o volume de 20 µL três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.

Proceda da mesma forma com os **HHV8 Q - PCR Standards 103, 104, 105**.

- Vede com precisão a **microplaca da amplificação** com recurso à **folha vedante da amplificação**.
- Transfira a **microplaca da amplificação** para o ciclo térmico em tempo real na área de amplificação/detecção de produtos de amplificação e inicie o ciclo térmico para a amplificação guardando a definição da sessão com um nome de ficheiro inequívoco e reconhecível (por ex., "ano-mês-dia-HHV8-EGSpA").

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

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



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

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

Análise qualitativa dos resultados

Os valores registados da fluorescência emitida pela sonda específica do HHV8 (detetor FAM "HHV8") e pela sonda específica do Controlo Interno (detetor VIC "CI") nas reações de amplificação devem ser analisados pelo software do instrumento.

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

Nota: No caso de uma amostra positiva com um elevado título de ADN de HHV8, a fluorescência FAM da sonda específica do HHV8 pode começar a aumentar antes do 15º ciclo. 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 "HHV8" 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 "HHV8" para **0,2**;
- defina manualmente o **Limiar** para o detetor VIC "CI" para **0,1**.

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

Na reação de amplificação **Controlo positivo***, o valor de **Ct** do HHV8 (Resultados > Relatório) é usado para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Detetor de reação de controlo positivo FAM "HHV8"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação **Controlo positivo** for **Ct > 25** ou **Ct não determinado** para HHV8, o ADN alvo não foi corretamente detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação ou deteção (distribuição incorreta da mistura de reação ou do controlo positivo, degradação da mistura de reação ou do controlo positivo, definição incorreta da posição do controlo positivo, definição incorreta do ciclo térmico) que podem originar resultados incorretos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

***Nota:** Quando este produto for usado para a quantificação de ADN de HHV8, foram preparadas as reações de **Q - PCR Standard** em vez da reação de **Controlo positivo**. Neste caso, valide a amplificação e a deteção através da referência à reação de amplificação de **Q - PCR Standard 10s (Ct ≤ 25)**.

Na reação de amplificação **Controlo negativo**, o valor de **Ct** do HHV8 (Resultados > Relatório) é usado para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Negative Control reaction detector FAM "HHV8"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct não determinado	NEGATIVO	CORRETO

Se o resultado da reação de amplificação **Controlo negativo** for diferente de **Ct não determinado** para HHV8, o ADN alvo não foi detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação (contaminação), que podem originar resultados incorretos e falsos positivos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

Na reação de amplificação de cada **amostra**, o valor de **Ct** do HHV8 é usado para determinar o ADN alvo, enquanto o valor de **Ct** do Controlo Interno é usado para validar a extração, amplificação e deteção.

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

Este produto é capaz de detetar uma quantidade mínima de cerca de 10 cópias de ADN do gene da proteína do capsídeo menor do HHV8 na reação de amplificação, que corresponde aos Equivalentes do genoma por reação (limite de deteção para o produto, consulte o parágrafo Características de desempenho).

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

Reação da amostra		Adequação da amostra	Resultado do ensaio	HHV8 DNA
detetor FAM "HHV8"	detetor VIC "IC"			
Ct não determinado	Ct > 35 ou Ct não determinado	inadequado	inválido	-
	Ct ≤ 35	adequado	válido, negativo	NÃO DETETADO
Ct determinado	Ct > 35 ou Ct não determinado	adequado	válido, positivo	DETETADO
	Ct ≤ 35	adequado	válido, positivo	DETETADO

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct não determinado** para o HHV8 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 (perda de ADN durante a extração ou presença de inibidores) que podem originar resultados incorretos e falsos negativos. A amostra não é adequada, o ensaio é inválido e precisa ser repetido, começando pela extração de uma nova amostra.

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra for **Ct não determinado** para o HHV8 e **Ct ≤ 35** para o Controlo Interno, significa que o ADN do HHV8 não é detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode excluir-se o facto de o ADN do HHV8 ter um título mais baixo que o limite de deteção do produto (consulte o parágrafo sobre as Características de desempenho). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

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

Nota: Quando o ADN do HHV8 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 HHV8. Neste caso, a amostra é contudo adequada e o resultado positivo do ensaio é válido.

Análise quantitativa dos resultados

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

Nas reações de amplificação dos quatro **Q - PCR standards**, os valores de **Ct** do HHV8 são usados para calcular a **Curva Standard** (Resultados > Curva Standard) para a sessão de amplificação e para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Standard Curve detector FAM "HHV8"	Intervalo de aceitação	Amplificação/deteção
Coefficiente de correlação (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRETO

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

Os valores de **Ct** do HHV8 na reação de amplificação de cada **amostra** e a **Curva standard** da sessão de amplificação são usados para calcular a **Quantidade** de ADN alvo presente nas reações de amplificação das amostras.

Este produto é capaz de quantificar desde 1.000.000 a 10 cópias de ADN do gene da proteína do capsídeo menor do HHV8 na reação de amplificação, que corresponde aos Equivalentes do genoma por reação (intervalo de medição linear do produto, consulte Características de desempenho), tal como descrito na tabela seguinte:

Sample result detector FAM "HHV8"	Equivalentes do genoma HHV8 por reação
Quantidade > 1 x 10 ⁶	MAIS DE 1.000.000
1 x 10 ¹ ≤ Quantidade ≤ 1 x 10 ⁶	= Quantidade
Quantidade < 1 x 10 ¹	MENOS DE 10

Os resultados (**Quantidade**) das reações de amplificação para as **amostras** (Resultados > Relatório) são usados para calcular os equivalentes do genoma (**gEq**) do HHV8 presente na amostra extraída (**Nc**) de acordo com esta fórmula:

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

Onde:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fórmula simplificada para sangue completo e «EXTRAblood»
$Nc \text{ (gEq/mL)} = 25 \times \text{Quantidade}$

Cálculo dos limites do intervalo de medição linear

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

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

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

Quando é usado o «ELiTe STAR» com amostras de sangue completo, plasma colhido em EDTA, a fórmula passa a ser:

Limites do intervalo de medição (gEq/mL) com «ELiTe STAR System»
$\text{Limite inferior (gEq/mL)} = 28 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Limite superior (gEq/mL)} = 28 \times 1.000.000 \text{ gEq}$
de 280 a 28.000.000 gEq/mL

Quando é usado o «ELiTe GALAXY» com amostras de sangue completo, plasma colhido em EDTA, a fórmula passa a ser:

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

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

Limites do intervalo de medição (gEq/mL) com «NucliSENS® easyMAG®»
$\text{Limite inferior (gEq/mL)} = 50 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Limite superior (gEq/mL)} = 50 \times 1.000.000 \text{ gEq}$
de 500 a 50.000.000 gEq/mL

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

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

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

passa a ser:

Limites do intervalo de medição (gEq/mL) com «QIASymphony® SP/AS»
$\text{Limite inferior (gEq/mL)} = 23 \times 10 \text{ gEq}$
$\text{Limite superior (gEq/mL)} = 23 \times 1.000.000 \text{ gEq}$
de 230 a 23.000.000 gEq/mL

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

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

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade analítica: limite de deteção

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

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

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

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

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de sangue completo e o ELiTe GALAXY foi verificada com um painel de diluições de HHV8 dentro da concentração limite. O painel foi preparado diluindo o HHV8 Culture Fluid (ZeptoMetrix Corporation) em sangue completo EDTA negativo para ADN de HHV8. As concentrações virais variaram de 10 gEq/mL a 560 gEq/mL. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração e Configuração PCR com o ELiTe GALAXY e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

A sensibilidade analítica como gEq/mL está reportada a seguir

Limite de deteção para amostras de sangue completo e ELiTe GALAXY (gEq/mL)			
intervalo de 95% de confiança			
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	117 gEq/mL	72 gEq/mL	326 gEq/mL

A sensibilidade analítica deste ensaio usado em associação com amostras de plasma e o ELiTe GALAXY foi verificada com um painel de diluições de HHV8 dentro da concentração limite. O painel foi preparado através da diluição de HHV8 Culture Fluid (ZeptoMetrix Corporation) (ZeptoMetrix Corporation) e plasma EDTA negativo para ADN de HHV8. As concentrações virais variaram de 10 gEq/mL a 560 gEq/mL. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise, extração e Configuração PCR com o ELiTe GALAXY e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A. A análise estatística foi realizada pela regressão Probit. O limite de deteção foi calculado para as concentrações em que a probabilidade de um resultado positivo é de 95%.

A sensibilidade analítica como gEq/mL está reportada a seguir

Limite de detecção para amostras de plasma e ELITe GALAXY (gEq/mL)			
		intervalo de 95% de confiança	
		limite inferior	limite superior
95% de positividade	98 gEq/mL	58 gEq/mL	336 gEq/mL

Sensibilidade analítica: intervalo de medição linear

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

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

A análise dos dados obtidos, realizada por regressão linear, demonstrou que o ensaio mostra uma resposta linear para todas as diluições (coeficiente de correlação linear superior a 0,99).

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

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

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

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

Os limites do intervalo de medição linear como gEq/mL referentes ao kit de extração usado são calculados na página 23.

Sensibilidade analítica: Precisão e exatidão

A precisão do ensaio, enquanto variabilidade dos resultados obtidos com várias réplicas de uma amostra testada dentro da mesma sessão de amplificação, permitiu obter uma percentagem média do Coeficiente de variação (% CV) de cerca de 24,5% das quantidades medidas, dentro do intervalo de 106 moléculas a 101 moléculas nos 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

A precisão do ensaio, enquanto diferença entre a média dos resultados obtidos com várias réplicas de uma amostra dentro da mesma sessão de amplificação e o valor de concentração teórica da amostra, permitiu obter uma percentagem média de Imprecisão (% Imprec.) de cerca de 8,8% das quantidades medidas, dentro do intervalo de 106 moléculas a 101 moléculas nos 20 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

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

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

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

A análise das regiões escolhidas para a hibridização dos primários e da sonda fluorescente no alinhamento das sequências disponíveis na base de dados para o gene da proteína do capsídeo menor de HHV8 revelou a respetiva conservação e ausência de mutações significativas.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi testada com recurso a algumas amostras clínicas de sangue completo colhidas em EDTA, positivo para ADN de HHV8.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 19 amostras de sangue completo colhido em EDTA positivas para ADN de HHV8 (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Não.	positivo	negativo
Sangue completo colhido em EDTA e positivo para ADN de HHV8	19	18	1

Uma amostra comunicou um resultado negativo com produtos ELITechGroup S.p.A.. Esta discordância pode ser explicada pelo facto de o título de HHV8 ser muito baixo e ser inferior ao limite de detecção do método utilizado (250 gEq/mL).

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi de 94,7%.

A sensibilidade diagnóstica foi avaliada usando 30 amostras de plasma colhidas em EDTA negativas para ADN de HHV8, que foram reforçadas para ADN de HHV8 adicionando uma amostra de HHV8 Culture fluid (ZeptoMetrix, EUA) e foram colhidas 30 amostras de sangue completo colhidas em EDTA negativas para ADN de HHV8, que foram reforçadas para ADN de HHV8 adicionando amostra de HHV8 Culture fluid (ZeptoMetrix, USA). Cada amostra foi usada para realização de todo o procedimento de análise: extração com **ELITe STAR** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue completo colhido em EDTA reforçado para ADN de HHV8	30	30	0
Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de HHV8	30	30	0

Todas as amostras reforçadas foram corretamente detetadas como positivas para ADN de HHV8. A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 100%.

A sensibilidade diagnóstica foi avaliada usando 31 amostras de plasma negativas para ADN de HHV8, que foram reforçadas para ADN de HHV8 adicionando uma amostra de HHV-8 Culture fluid (ZeptoMetrix, EUA) e foram colhidas 30 amostras de sangue completo negativas para ADN de HHV8, que foram reforçadas para ADN de HHV8 adicionando amostra de HHV-8 Culture fluid (ZeptoMetrix, USA). Cada amostra foi usada para a realização de todo o procedimento de análise: extração e Configuração PCR com o **ELITe GALAXY** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue completo colhido em EDTA reforçado para ADN de HHV8	30	30	0
Plasma colhido em EDTA reforçado para ADN de HHV8	31	30	0

Uma amostra de plasma foi excluída do estudo pois foi considerada inválida na amplificação. Este resultado foi confirmado com uma segunda amplificação e deve-se provavelmente à presença de um inibidor.

30 amostras de plasma tiveram resultado válido para análise e foram todas confirmadas positivas. Todas as amostras de sangue completo reforçadas foram corretamente detetadas como positivas para ADN de HHV8.

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

Especificidade analítica: ausência de reatividade cruzada com marcadores potencialmente interferentes

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

A análise do alinhamento das sequências dos primários e da sonda fluorescente com as sequências

HHV8 ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS038PLD

disponíveis nas bases de dados para organismos diferentes do HHV8, incluindo o genoma completo EBV, o vírus humano Herpes, que é mais semelhante ao HHV8, 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 HHV8 e positivas para ADN de outros patogénicos.

A especificidade analítica foi verificada utilizando como material de referência 20 amostras de plasma colhido em EDTA, que foram negativas para ADN de HHV8 mas positivas para ADN de BKV, EBV, HHV8 (testadas com produtos de amplificação CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Não.	positivo	negativo
Amostras de sangue completo colhido em EDTA e positivo para ADN de BKV	4	0	4
Amostras de sangue completo colhido em EDTA e positivo para ADN de EBV	7	0	7
Amostras de sangue completo colhido em EDTA e positivo para ADN de HHV8	9	0	9

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

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas negativas, foi testada com recurso a algumas amostras clínicas de sangue completo colhidas em EDTA, negativas para ADN de HHV8.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando como material de referência 20 amostras de sangue completo colhido em EDTA negativas para ADN de HHV8 (testadas com um produto de amplificação em tempo real CE IVD). Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, por produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Não.	positivo	negativo
Sangue completo colhido em EDTA e negativo para ADN de HHV8	20	0	20

A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi superior a 95%.

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 30 amostras de plasma colhido em EDTA que foram presumivelmente negativas para ADN de HHV8 e 30 amostras de sangue completo colhido em EDTA que foram presumivelmente negativas para ADN de HHV8 (testadas com um método de amplificação em tempo real). Cada amostra foi usada para realização de todo o procedimento de análise: extração com **ELITe STAR** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Sangue completo colhido em EDTA e negativo para ADN de HHV8	30	0	27
Plasma colhido em EDTA negativo para ADN de HHV8	30	0	30

Três amostras apresentaram resultado inválido.

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

A especificidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 30 amostras de plasma colhido em EDTA que foram presumivelmente negativas para ADN de HHV8 e 30 amostras de sangue completo colhido em EDTA que foram presumivelmente negativas para ADN de HHV8 (testadas com um método de amplificação em tempo real). Cada amostra foi usada para a realização de todo o procedimento de análise: extração e Configuração PCR com o **ELITe GALAXY System** e amplificação com produtos ELITechGroup S.p.A.

HHV8 ELITe MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS038PLD

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Plasma colhido em EDTA negativo para ADN de HHV8	30	0	30
Sangue completo colhido em EDTA e negativo para ADN de HHV8	30	0	30

Todas as amostras foram corretamente detetadas como negativas para ADN de HHV8. A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste 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 "HHV8 ELITe MGB® Kit", FTP RTS038PLD.

REFERÊNCIAS

B. Bigoni et al (1996) *J Inf Dis* 173: 542 - 549
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

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

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: biopsias cutâneas.

Este este produto apenas com instrumentos validados e amostras clínicas associadas indicados na secção "Amostras e controlos".

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

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

Devido à sua elevada sensibilidade analítica, o método de amplificação em Tempo real usado neste produto é sensível a contaminações cruzadas a partir de amostras clínicas positivas do HHV8, dos controlos positivos e dos mesmos produtos de amplificação. Contaminações cruzadas causadas por falsos resultados positivos. O formato do produto é capaz de limitar as contaminações cruzadas; no entanto, estas apenas podem ser evitadas com boas práticas laboratoriais e seguindo cuidadosamente este manual de instruções de utilização.

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

Este produto requer o uso de vestuário e áreas de trabalho que sejam adequados para o processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

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

Quando a sessão de amplificação for configurada manualmente, é necessário ter áreas separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação, para evitar falsos resultados positivos.

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

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

Um resultado negativo obtido com este produto significa que o ADN de HHV8 não foi detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode negligenciar-se o facto de o ADN de HHV8 ter um título mais baixo que o limite de deteção do produto (Ver Características de desempenho). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

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

Possíveis polimorfismos na região do genoma viral abrangido pelos primários do produto e as sondas podem prejudicar a deteção e quantificação do ADN de HHV8.

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

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

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

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

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

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

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

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

SÍMBOLOS

-  Número do catálogo.
-  Limite máximo da temperatura.
-  Ref. do lote
-  Usar até (último dia do mês).
-  Dispositivo médico de 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.
-  Manter afastado da luz solar.
-  Fabricante.

**NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA
LIMITADA**

Este produto contém reagentes com licença do LTC.

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

Os reagentes de deteção ELITe MGB® são abrangidos por um ou mais dos números de patente dos EUA 6.127.121, 6.485.906, 6.660.845, 6.699.975, 6.727.356, 6.790.945, 6.949.367, 6.972.328, 7.045.610, 7.319.022, 7.368.549, 7.381.818, 7.662.942, 7.671.218, 7.715.989, 7.723.038, 7.759.126, 7.767.834, 7.897.736, 8.008.522, 8.067.177, 8.163.910, 8.389.745, 8.969.003, 8.980.855, 9.056.887, 9.085.800, 9.169.256 e números de patente EP, 0819133, 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 bem como pedidos que estejam atualmente pendentes.

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

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

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

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

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

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

HHV8 ELITE MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS038PLD



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

A. Intended use

The HHV8 ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection and quantification of Herpes human virus 8 (HHV8)**. The assay is CE-IVD validated in combination with the instruments **ELITE InGenius®** and **ELITE BeGenius®**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HHV8	minor capsid protein gene (ORF26)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525 (VIC)

C. Validated matrix

› **Whole blood** EDTA

› **Plasma** EDTA

D. Kit content

HHV8 Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

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

E. Material required not provided in the kit

- › **ELITE InGenius instrument:** INT030
- › **ELITE BeGenius instrument:** INT040
- › **ELITE InGenius SP200 Extraction Cartridge:** INT032SP200
- › **ELITE InGenius PCR Cassette:** INT035PCR
- › **ELITE InGenius SP200 Consumable Set:** INT032CS
- › **CPE - Internal Control:** CTCRCPE
- › **HHV8 ELITE Standard :** STD038PLD
- › **HHV8 - ELITE Positive Control :** CTR038PLD
- › **ELITE InGenius Waste Box :** F2102-000
- › **300 µL Filter Tips Axygen :** TF-350-L-R-S
- › **1000 µL Filter Tips Tecan :** 30180118

F. Protocol

- | | | | |
|-------------------------------|--------|-------------------------------|---------|
| › Sample volume | 200 µL | › Unit of quantitative result | 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 | 20 µL | | |
| › HHV8 Q-PCR Mix volume | 20 µL | | |

G. Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	117 cp/mL	100% 30/30*	100% 32/32*
Plasma	98 cp/mL	100% 30/30*	100% 32/32*

*confirmed samples/ tested samples

Matrix	Linearity (copies/mL)
Whole Blood	117 – 1,000,000
Plasma	98 – 1,000,000

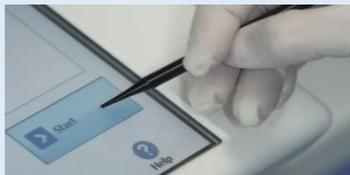
H. Procedures ELITE InGenius

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

Before analysis

<p>1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"</p>	<p>2. Verify calibrators: HHV8 Q-PCR standard in the "Calibration menu" Verify controls: HHV8 pos. and neg. controls in the "Control menu" <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired</p>	<p>3. Thaw the HHV8 Q- PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec</p>
--	---	--

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

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

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

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

I. Procedures ELITE BeGenius

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

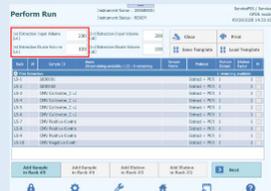
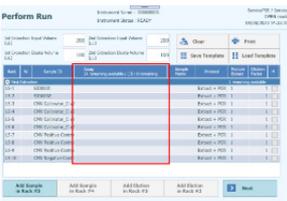
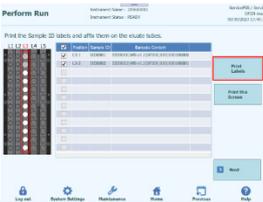
Before analysis

1. Switch on ELITE BeGenius Identification with username and password
Select the mode "Closed"
2. Verify calibrators: HHV8 Q-PCR standard in the "Calibration menu"
Verify controls: HHV8 pos. and neg. controls in the "Control menu"
NB: Both have been run, approved and not expired
3. Thaw the HHV8 Q- PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes
Vortex gently
Spin down 5 sec

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

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

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

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

4. Select the "Assay protocol" of interest

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

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

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

8. Close the door. Start the run

9. View, approve and store the results


Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

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

HHV8 ELITE MGB® Kit used with ABI PCR instrument



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

A. Intended use

The HHV8 ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection** and **quantification** of the DNA of **Herpes human virus 8 (HHV8)**.

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

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HHV8	minor capsid protein gene (ORF26)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525 (VIC)

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA

› Plasma EDTA

› Cerebrospinal fluid

D. Kit content

HHV8 Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

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

E. Material required not provided in the kit

- › 7500 Fast Dx and 7300 PCR Instrument
- › ELITE STAR: INTO10
- › ELITE STAR 200 extraction kit: INTO11EX
- › ELITE GALAXY: INTO20
- › ELITE GALAXY 300 extraction kit: INTO21EX

- › HHV8 ELITE Positive Control: CTR038PLD
- › HHV8 ELITE Standard: STD038PLD
- › CPE Internal Control: CTRCPE
- › easyMAG - Generic protocol 2.0.1
- › QIASymphony - DNA Mini kit or DSP Virus/Pathogen Midi kit
- › Molecular biology grade water

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ELITE STAR - ABI	Whole Blood	–	100% (30/30)*	100% (27/30)*
	Plasma	–	100% (30/30)*	100% (30/30)*
ELITE GALAXY - ABI	Whole Blood	117 gEq/mL	100% (30/30)*	100% (30/30)*
	Plasma	98 gEq/mL	100% (30/30)*	100% (30/30)*

System	Linearity	Conversion factor cp/reaction to cp/mL
ELITE STAR - ABI	280 → 28 x 10 ⁶ (WB, PL)	28 (WB, PL)
ELITE GALAXY - ABI	350 → 35 x 10 ⁶ (WB, PL)	35 (WB, PL)
easyMAG - ABI	500 → 50 x 10 ⁶ (WB)	50 (WB)
QIASymphony - ABI	230 → 23 x 10 ⁶ (WB)	23 (WB)
	120 → 12 x 10 ⁶ (PL)	12 (PL)
EXTRAblood - ABI	250 → 25 x 10 ⁶ (WB)	25 (WB)

G. Procedure

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

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELiTe Star	Whole Blood, Plasma	200 µL	700 µL	100 µL	200µL
ELiTe Galaxy	Whole Blood, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	CSF	500 µL	-	100 µL	5 µL
EasyMAG	Whole Blood	100	-	50	
QIASymphony	Whole Blood,	200 µL	400 µL	95 µL	10 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

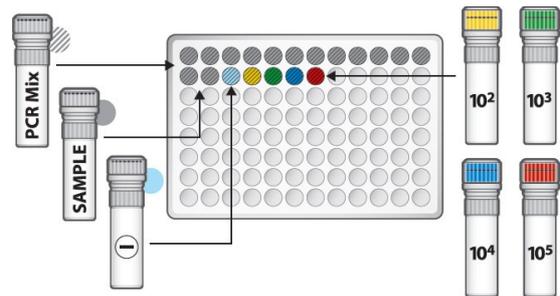
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "HHV8" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profil as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C

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

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

Amplification - PCR Set -up

1. Thaw HHV8 Q PCR-Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet **20 µL** of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add, **20 µL** of extracted DNA in sample wells, **20 µL** of molecular grade water in Negative Control well, and **20µL** of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells, if quantitative, **20 µL** of the Positive Control, if qualitative. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification - Threshold for qualitative analysis

Instrument	HHV8 FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	0.1	0.05

Interpretation - Qualitative results

HHV8 Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	-	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The HHV8 ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction.

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

