

	 EMPOWERING IVD
	 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: <a href="mailto:emd.support@elitechgroup.com">emd.support@elitechgroup.com</a> WEB site: <a href="http://www.elitechgroup.com">www.elitechgroup.com</a>

## NOTICE of CHANGE dated 16/02/2023

### IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

# «HEV ELITe MGB<sup>®</sup> Kit» Ref. RTS130ING

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

- *Troubleshooting section: added the possibility of discriminating possible mutants by the presence of a defined peak of the Melting Temperature with a value different from that of the Positive Control*
- *New data of Inclusivity*

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



## HEV ELITE MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e amplificação em tempo real de cADN

REF RTS130ING



### 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 4
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 5
PROCEDIMENTO	página 7
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	página 13
REFERÊNCIAS	página 18
LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	página 18
RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	página 19
SÍMBOLOS	página 21
NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	página 22

### UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto «HEV ELITE MGB® Kit» faz parte de um ensaio quantitativo de transcrição reversa e amplificação de ácidos nucleicos para a **deteção e quantificação do ARN** do vírus Hepatite E (HEV) em amostras de ARN extraídas de amostras clínicas.

O ensaio é capaz de detetar o ARN do HEV pertencente aos genótipos 1, 2, 3, 3a e 4.

O ensaio deve ser realizado em associação com o sistema **ELITE InGenius®** a partir de amostras de plasma colhido em EDTA e sobrenadante fecal.

O produto está previsto para utilização no diagnóstico de hepatite causada pelo HEV, em conjunto com os dados clínicos do doente e outros resultados de testes laboratoriais.

**Kit HEV ELITE MGB®**  
reagentes para transcrição reversa de ARN e amplificação em tempo real de cADN

REF RTS130ING

### PRINCÍPIO DO ENSAIO

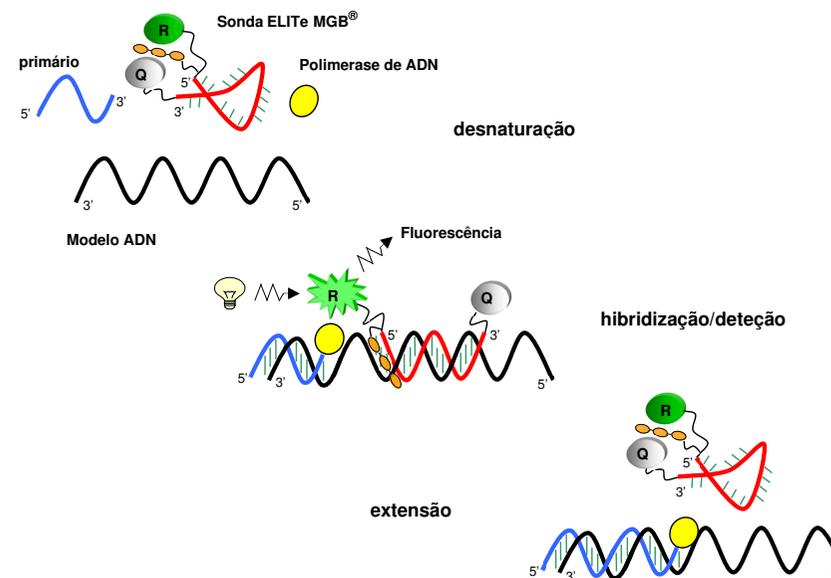
O ensaio consiste numa transcrição reversa e numa reação de amplificação em tempo real (método one-step).

Começando pelo ARN extraído da amostra a ser testada, na cassette PCR é realizada uma reação de transcrição reversa e amplificação específica da região ORF-2 do HEV e para uma região do ARN genómico do fago MS2 (Controlo Interno exógeno da extração e inibição).

A sonda específica do HEV com tecnologia ELITE MGB®, etiquetada com fluoróforo FAM, é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação do HEV. A sonda específica do Controlo Interno com tecnologia ELITE MGB®, etiquetada com fluoróforo AP525, 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 determina a presença e o título do ARN do HEV na amostra.

O ensaio foi validado em associação com o **ELITE InGenius**, um sistema integrado e automático para extração, amplificação e deteção de ácidos nucleicos e interpretação de resultados.

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 e cálculo da temperatura de fusão.



### DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto «HEV ELiTe MGB® Kit» fornece os seguintes componentes:

- **HEV PCR Mix**

Uma mistura otimizada e estabilizada de oligonucleótidos e reagentes para transcrição reversa e amplificação em tempo real, **pré-aliquotada em quatro tubos de teste** (tampa BRANCA, sem inserção). Cada tubo contém **600 µL** de solução, suficiente para **24 testes** (processamento de, pelo menos, 5 amostras por sessão) em associação com o **ELiTe InGenius**.

Os primários e a sonda para o HEV (estabilizado pelo grupo MGB®, etiquetado por fluoróforo FAM e extinto por uma molécula não fluorescente) são específicos para a região ORF-2 do HEV. O sinal do HEV é detetado pelo Canal 1 do sistema **ELiTe InGenius**.

Os primários e a sonda para o Controlo Interno (estabilizado pelo grupo MGB®, etiquetado por fluoróforo AP525 e extinto por uma molécula não fluorescente) são específicos para uma região do ARN genómico **fago MS2**. O sinal do Controlo Interno (CI) é detetado pelo Canal 2 do sistema **ELiTe InGenius**.

A mistura da reação fornece também o tampão, cloreto de magnésio, os trifosfatos nucleotídicos e o fluoróforo AP593, que podem ser usados como referência passiva para normalização da fluorescência, bem como a enzima de polimerase de ADN com capacidade de arranque a quente.

- **RT EnzymeMix**

Um mistura otimizada e estabilizada de enzimas para transcrição reversa, **pré-aliquotada em dois tubos de teste** (tampa com inserção PRETA). Cada tubo contém **20 µL** de solução, suficiente para **48 testes** em associação com o **ELiTe InGenius**.

A mistura fornece a enzima para a transcrição reversa.

O produto é suficiente para **96 testes em associação com o «ELiTe InGenius»**, incluindo controlos.

### MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
HEV PCR Mix	mistura de reagentes para transcrição reversa e amplificação em tempo real <b>tampa BRANCA</b>	4 x 600 µL	-
RT EnzymeMix	Transcriptase reversa <b>tampa com inserção PRETA</b>	2 x 20 µL	-

### MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- Exaustor de fluxo de ar laminar.
- Luvas sem pó de nitrilo descartáveis ou material semelhante.
- Misturador de vórtice.
- Microcentrifugadora de bancada (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas e pontas esterilizadas com filtro de aerossóis ou pontas esterilizadas de deslocação positiva (2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Tubo Sarstedt de 2,0 mL contornado e de tampa de rosca (Sarstedt Ref. 72.694.005).
- Água de qualidade para biologia molecular.

### OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

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

Para a extração de ácido nucleico automática, a amplificação em tempo real e a interpretação dos resultados das amostras a serem analisadas, é necessário o instrumento «**ELiTe InGenius**» (ELiTechGroup S.p.A., ref. INT030) e os seguintes protocolos de ensaio específicos (ELiTechGroup S.p.A.):

- parâmetros para amplificação de calibradores «**HEV ELiTe STD**»,
- parâmetros para amplificação de controlo positivo «**HEV ELiTe PC**»,
- parâmetros para amplificação de controlo negativo «**HEV ELiTe NC**»,
- parâmetros para amostras de plasma a serem analisadas «**HEV ELiTe PL\_200\_100**»,
- parâmetros para amostras fecais a serem analisadas «**HEV ELiTe ST\_200\_100**».

Com o instrumento «**ELiTe InGenius**» são necessários os seguintes produtos genéricos:

- cartuchos de extração «**ELiTe InGenius® SP 200**» (ELiTechGroup S.p.A., ref. INT032SP200),
- consumíveis para extração «**ELiTe InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELiTechGroup S.p.A., ref. INT032CS),
- cartuchos de amplificação «**ELiTe InGenius® PCR Cassette**» (ELiTechGroup S.p.A., ref. INT035PCR),
- pontas «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, EUA, ref. TF-350-L-R-S),
- caixas «**ELiTe InGenius® Waste Box**» (ELiTechGroup S.p.A., ref. F2102-000).

Como modelo do controlo interno de extração e inibição, é necessário o produto genérico «**CPE - Internal Control**» (ELiTechGroup S.p.A., ref. CTRCPE). Esta é uma solução estabilizada contendo dois ADNs plasmídeos e ARN genómico do fago MS2.

Se for necessária a deteção do ARN do HEV para análise qualitativa, use o produto específico «**HEV – ELiTe Positive Control**» (ELiTechGroup S.p.A., ref. CTR130ING). O produto fornece uma solução estabilizada de ADN plasmídeo.

Se for necessária a deteção e quantificação do ARN do HEV para análise quantitativa, use o produto específico «**HEV ELiTe Standard**» (ELiTechGroup S.p.A., ref. STD130ING). O produto fornece quatro diluições estabilizadas de ADN plasmídeo a uma concentração conhecida para obter a curva standard.

Um fator de conversão permite exprimir os resultados da análise quantitativa em Unidades Internacionais do HEV da "1.ª Norma Internacional da Organização Mundial de Saúde para ensaios baseados nas Técnicas de amplificação de ácido nucleico de ARN do vírus da Hepatite E" (PEI, Alemanha, código 6329/10).

### AVISOS E PRECAUÇÕES

**Este produto foi concebido 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 desperdícios 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.

**Kit HEV ELITe MGB®**  
reagentes para transcrição reversa de ARN e  
amplificação em tempo real de cADN

REF RTS130ING

Use vestuário e luvas de proteção adequados e proteja os olhos e o rosto.  
Nunca deve pipetar soluções com a boca.  
Não coma, beba, fume ou aplique produtos cosméticos nas áreas de trabalho.  
Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.  
Elimine os reagentes remanescentes e os desperdícios em conformidade com os regulamentos em vigor.  
Leia atentamente todas as instruções fornecidas com o produto antes de efetuar o ensaio.  
Durante a realização do ensaio, siga as instruções fornecidas com o produto.  
Não use o produto após a data de validade indicada.  
Use apenas os reagentes fornecidos com o produto e os recomendados pelo fabricante.  
Não use reagentes de lotes diferentes.  
Não use reagentes de outros fabricantes.

#### Avisos e precauções para biologia molecular

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

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

As amostras devem ser adequadas e, se possível, exclusivas para este tipo de análise. As amostras devem ser manuseadas sob um exaustor de fluxo de ar laminar. As pipetas usadas no manuseamento de amostras devem ser usadas exclusivamente para este fim específico. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, 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 transcrição reversa e amplificação devem ser preparados de forma a que possam ser usados numa sessão única. As pipetas usadas no manuseamento dos reagentes devem ser usadas exclusivamente para este fim. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

As Cassetes PCR devem ser manuseadas de modo a evitar a difusão do produto de amplificação para o ambiente e a contaminação da amostra e do reagente.

#### Avisos e precauções específicos para os componentes

##### HEV PCR Mix

A HEV PCR Mix deve ser guardada a -20 °C num local escuro.

A HEV PCR Mix pode ser congelada e descongelada um máximo de **cinco vezes**: quaisquer ciclos de congelamento/descongelação adicionais podem causar um menor desempenho do produto.

##### RT EnzymeMix

A RT EnzymeMix deve ser guardada a -20 °C.

A RT EnzymeMix não deve ser exposta a temperaturas superiores a -20 °C durante mais de 10 minutos. Pode ser congelada e descongelada um máximo de **dez vezes**.

## AMOSTRAS E CONTROLOS

O produto deve ser utilizado com as seguintes amostras clínicas:

#### Plasma colhido em EDTA

As amostras de plasma, destinadas à extração de ARN, devem ser colhidas em EDTA, transportadas e armazenadas à temperatura ambiente (+18/+30 °C) durante um máximo de vinte e quatro horas ou a +2/+8 °C durante um máximo de cinco dias. Caso contrário, devem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C durante 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 ARN a partir do plasma colhido em EDTA for realizada com o sistema **ELITe InGenius** e com o **Software ELITe InGenius** versão 1.3 (ou versões equivalentes mais recentes), use o protocolo de ensaio **HEV ELITe\_PL\_200\_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o **CPE** (Controlo Interno) a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

**Kit HEV ELITe MGB®**  
reagentes para transcrição reversa de ARN e  
amplificação em tempo real de cADN

REF RTS130ING

Os ácidos nucleicos purificados podem ser guardados a +2/+8 °C durante 16 horas ou a -20 °C durante um mês.

Quando for usado o tubo principal, o volume da amostra 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.

#### Fezes

As amostras de fezes, destinadas à extração de ARN, devem ser colhidas e identificadas de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas e guardadas a +2/+8 °C durante um período máximo de vinte e quatro horas. Caso contrário, devem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de trinta dias ou a -70 °C durante 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.

Antes da extração, recomenda-se o seguinte pré-tratamento:

- transfira cerca de 3 mL de fezes para o tubo cónico de 50 mL (que corresponde ao preenchimento da parte cónica inferior),
- adicione 5 mL de água de qualidade para biologia molecular,
- misture até a amostra estar homogénea,
- transfira 100 µL de amostra de fezes tratada com água para 900 µL de água de qualidade para biologia molecular para dentro do tubo de 1,5 mL,
- misture até a amostra estar homogénea,
- centrifugue a 13.000 RCF durante 1 minuto,
- transfira cuidadosamente 200 µL do sobrenadante fecal para um "Sonication tube" fornecido com o «**ELITe InGenius SP 200 Consumable Set**», tendo cuidado para não perturbar o material fecal granulado.

**Nota:** quando a extração de ARN das amostras de fezes humanas for realizada com o **ELITe InGenius** e com o **Software ELITe InGenius** versão 1.3 (ou versões equivalentes mais recentes), utilize o Protocolo de ensaio **HEV ELITe\_ST\_200\_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o **CPE** (Controlo Interno) a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Os ácidos nucleicos purificados podem ser guardados a +2/+8 °C durante 16 horas ou a -20 °C durante um mês.

#### Substâncias interferentes

As quantidades de ADN e/ou ARN genómico humano superiores a 1 µg extraídas da amostra podem inibir a reação de transcrição reversa e a amplificação em tempo real.

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

#### Calibradores da amplificação e controlos da amplificação

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

- como conjunto calibrador, use os quatro níveis de concentração do **HEV ELITe Standard** (não fornecido com este kit), em associação com o protocolo **HEV ELITe STD**,
- como Controlo positivo da amplificação, use o **HEV - ELITe Positive Control** (não fornecido com este kit), em associação com o protocolo **HEV ELITe\_PC**,
- como Controlo negativo da amplificação, use água de qualidade para biologia molecular (não fornecida com este kit) em associação com o protocolo **HEV ELITe\_NC**.

**Nota:** O sistema **ELITe InGenius** requer resultados aprovados e válidos da curva de calibração e dos controlos da amplificação para cada lote de reagente de amplificação guardado na respetiva base de dados. As curvas da calibração, aprovadas e guardadas na base de dados, irão expirar após **60 dias**. Na data de fim da validade será necessário fazer uma nova execução dos Q-PCR Standards definidos 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 controlos Positivo e Negativo 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 de amplificação,
- os resultados da análise de Controlo da qualidade (ver o parágrafo seguinte) se encontrarem fora da especificação,
- for realizada qualquer manutenção significativa no instrumento **ELITe InGenius**.

### Controlos da qualidade

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

## PROCEDIMENTO

O procedimento para utilização do «HEV ELiTe MGB® Kit» com o sistema ELiTe InGenius consiste em três passos:

- verificação da prontidão do sistema,
- preparação da sessão,
- revisão e exportação de resultados.

### Verificação da prontidão do sistema

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

- ligar o ELiTe InGenius e selecionar o modo de início de sessão "CLOSED" (Fechado),
- certificar-se de que os Calibradores (HEV Q-PCR Standard) foram executados, aprovados e não estão expirados (Estado) em associação com o lote do reagente de amplificação a ser usado. Se não existirem Calibradores aprovados ou válidos, execute-os como descrito nos parágrafos seguintes,
- certificar-se de que os controlos da amplificação (Controlos, HEV Positive Control, HEV Negative Control) foram executados, aprovados e não estão expirados (Estado) em associação com o lote do reagente de amplificação a ser usado. Se não existirem controlos da amplificação aprovados ou válidos, execute-os como descrito nos parágrafos seguintes,
- escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela ELiTechGroup S.p.A. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os kits ELiTe MGB®, o instrumento ELiTe InGenius e a matriz citada.

Os Protocolos de ensaio disponíveis para teste da amostra com o produto Kit HEV ELiTe MGB® estão descritos na tabela seguinte.

Protocolo de ensaio para o Kit HEV ELiTe MGB®			
Nome	Matriz	Relatório	Características
HEV ELiTe_PL_200_100	Plasma	Positivo/ cópias/mL/ IU/mL/ Negativo	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Controlo interno: 10 µL Sonicação: NÃO Volume de mistura PCR: 20 µL Volume de entrada PCR de amostra: 10 µL
HEV ELiTe_ST_200_100	Sobrenadante fecal	Positivo/ cópias/mL/ Negativo	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Controlo interno: 10 µL Sonicação: NÃO Volume de mistura PCR: 20 µL Volume de entrada PCR de amostra: 10 µL

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

### Preparação da sessão

O produto HEV ELiTe MGB® Kit pode ser usado com o sistema ELiTe InGenius para realizar:

- A. Execução integrada (Extração + PCR),
- B. Execução de amplificação (apenas PCR),
- C. Execução da calibração (apenas PCR),
- D. Execução de amplificação para Controlo positivo e Controlo negativo (apenas PCR).

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

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

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

1. Se necessário, descongele à temperatura ambiente (+18/ 25 °C) os tubos de teste que contêm as amostras a serem analisadas. Misture por meio de vórtice durante 10 segundos, centrifugue os tubos durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo e mantenha em gelo.
2. Descongele durante 30 minutos à temperatura ambiente (+18/25 °C) os tubos de teste HEV PCR Mix (tampa BRANCA) necessários para a sessão, lembrando-se que o conteúdo de cada tubo de teste é suficiente **24 testes**. Misture por meio de vórtice durante 10 segundos três vezes, centrifugue os tubos durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo e mantenha em gelo.
3. Remova os tubos RT EnzymeMix (tampa com inserção PRETA) necessários para a sessão, lembrando-se que o conteúdo de cada tubo de teste é suficiente para preparar **48 testes**. Agite suavemente os tubos, centrifugue durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo e mantenha em gelo.

**Nota:** A RT EnzymeMix não deve ser exposta a temperaturas superiores a -20 °C durante mais de 10 minutos.

4. Prepare um tubo de 2 mL com tampa de rosca (Sarstedt Ref. 72.694.005, não incluído no kit) para a **mistura de reação completa** e marque-o de forma reconhecível com um marcador permanente.
5. Calcule os volumes dos dois componentes fornecidos por kit que são necessários para a preparação da **mistura de reação completa** com base no número de amostras a serem analisadas, tal como descrito na tabela seguinte.

**Nota:** Para calcular os volumes dos dois componentes a serem usados para a preparação da **mistura de reação completa**, é necessário definir o número de amostras (N) a serem testadas na sessão e seguir a tabela seguinte.

Número de amostras (N)	Mistura PCR do HEV	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0,3 µL
6 ≤ N ≤ 12	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0,3 µL

6. Prepare a **mistura de reação completa** adicionando ao tubo de 2 mL dedicado os volumes calculados dos dois componentes.
7. Misture por **meio de vórtice a baixa velocidade** durante 10 segundos três vezes, centrifugue os tubos durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo e mantenha em gelo.

**Nota:** A **mistura de reação completa** deve ser usada em 7 horas se for mantida no bloco refrigerado. A mistura de reação completa **não pode** ser guardada.

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

#### A. Execução integrada

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

1. Descongele os tubos CPE para a sessão. Cada tubo é suficiente para 12 extrações. Misture suavemente, centrifugue durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo e mantenha em gelo.
2. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
3. 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 "Track" de interesse preencha a "SampleID" (SID) digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
5. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (por ex., HEV ELiTe\_PL\_200\_100).
6. Certifique-se de que o "Protocol" apresentado é: "Extract + PCR".
7. Selecione a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position":
  - se for usado um tubo primário, selecione "Primary Tube",
  - se for usado um tubo secundário, selecione "Sonicator Tube".
 Clique em "Next" para continuar a preparação.
8. Carregue a **mistura de reação completa** e o CPE no "Inventory Block" selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.

- Carregue as "PCR Cassette", os cartuchos de extração "ELITE InGenius SP 200", todos os consumíveis necessários e as amostras a serem extraídas nas posições especificadas no passo 8, seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o 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, identificada e guardada a -20 °C durante um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

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

**Nota:** A **mistura de reação completa** pode ser mantida no bloco refrigerado até 2 sessões de trabalho de 3 horas cada e durante o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão de trabalho.

#### B. Execução de amplificação

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

- Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
- Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Extraction Input Volume" é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" é de 100 µL.
- Para cada Rastreo de interesse preencha a SID digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
- Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (por ex., HEV ELITE\_PL\_200\_100).
- Selecione "PCR Only" na coluna "Protocolo".
- Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" é "Elution Tube (bottom row)". Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a **mistura de reação completa** no "Inventory Block" selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue as "PCR Cassette" e as amostras de Ácido nucleico extraídas seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione "Star" 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 Reaction Cassette com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem contaminações ambientais. Evite quaisquer derrames dos produtos de reação.

**Nota:** A **mistura de reação completa** pode ser mantida no bloco refrigerado até 2 sessões de trabalho de 3 horas cada e durante o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão de trabalho.

#### C. Execução de calibração

Para configurar uma execução Calibração, execute os passos seguintes de acordo com a GUI:

- Descongele os tubos **HEV Q-PCR Standard** (Cal1: HEV Q-PCR Standards 10<sup>2</sup>, Cal2: HEV Q-PCR Standards 10<sup>3</sup>, Cal3: HEV Q-PCR Standards 10<sup>4</sup>, Cal4: HEV Q-PCR Standards 10<sup>5</sup>). Cada tubo é suficiente para preparar 4 reações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
- Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Extraction Input Volume" é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" é de 100 µL.
- Selecione o Protocolo do ensaio "HEV ELITE\_STD" na coluna "Assay" e preencha o número do lote e a data de validade do **HEV Q-PCR Standard**.
- Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a **mistura de reação completa** no "Inventory Block" selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Seguinte" para continuar a preparação.
- Carregue/verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Seguinte" para continuar a preparação.
- Carregue as "Cassetes PCR", os tubos **HEV Q-PCR Standard** seguindo as instruções na GUI. Clique em "Seguinte" para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione "Star" 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, os restantes **HEV Q-PCR Standards** devem ser removidos do instrumento, tapados e guardados a -20 °C.

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

**Nota:** A **mistura de reação completa** pode ser mantida no bloco refrigerado até 2 sessões de trabalho de 3 horas cada e durante o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão de trabalho.

#### D. Execução de amplificação para Controlo positivo e Controlo negativo

Para preparar a execução de amplificação para o Controlo positivo e Controlo negativo, realize os passos seguintes em conformidade com a GUI:

- Descongele os tubos do **HEV Positive Control** para a sessão. Cada tubo é suficiente para preparar 4 reações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Transfira pelo menos 50 µL de água de qualidade para biologia molecular para um "Elution tube", fornecido com o Conjunto de consumíveis ELITE InGenius SP 200.
- Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
- No "Track" de interesse, selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay".
- Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Extraction Input Volume" é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" é de 100 µL.
- Para o controlo positivo, selecione o Protocolo de ensaio "HEV ELITE\_PC" na coluna "Assay" e preencha o número do lote e a data de validade do **Controlo positivo HEV**,
- Para o controlo negativo, selecione o Protocolo de ensaio "HEV ELITE\_NC" e preencha o número do lote e a data de validade da água de qualidade para biologia molecular.
- Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a **mistura de reação completa** no "Inventory Block" selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue/verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.

- Carregue as "PCR Reaction Cassette", o tubo **HEV Positive Control** e o tubo de controlo negativo seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

**Nota:** A **mistura de reação completa** pode ser mantida no bloco refrigerado até 2 sessões de trabalho de 3 horas cada e durante o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão de trabalho.

#### Revisão e exportação 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" o "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 sistema **ELiTe InGenius** gera os resultados com o produto **HEV ELiTe MGB® Kit** através do seguinte procedimento:

- Validação da Curva de calibração,
- Validação dos resultados do Controlo positivo e Controlo negativo,
- Validação dos resultados da amostra,
- Elaboração do relatório do resultado da amostra.

#### A. Validação da Curva de calibração

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda para HEV (Canal 1 "HEV") nas reações de amplificação do Calibrador são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos no protocolo de ensaio "HEV 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 "Failed" no ecrã "Calibration" 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, toda a sessão é inválida. Neste caso, também deve ser repetida a amplificação de todas as amostras.

#### B. Validação dos resultados do Controlo positivo e Controlo negativo

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda para HEV (Canal 1 "HEV") na reação 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 "HEV ELiTe\_PC" e "HEV ELiTe\_NC".

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

Os resultados das execuções de amplificação de Controlo positivo e Controlo negativo são usados pelo software do instrumento para calcular a preparação dos "Control Charts". São necessários quatro resultados de Controlo positivo e Controlo negativo, de quatro execuções diferentes, para preparar o "Control Charts". Após isso, os resultados do Controlo positivo e do Controlo negativo 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 "Failed" no ecrã "Controls" e não é possível aprovar o mesmo. Neste caso, foi repetida a reação do Controlo positivo ou Controlo negativo da amplificação.

**Nota:** Se o Controlo positivo ou o Controlo negativo for executado em conjunto com amostras a serem testadas e o respetivo resultado for inválido, toda a sessão é inválida. Neste caso, também deve ser repetida a amplificação de todas as amostras.

#### C. Validação dos resultados da amostra

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda para HEV (Channel 1 "HEV") e pela sonda de Controlo interno (Channel 2 "CI") nas reações de amplificação da amostra são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos no Protocolo de ensaio HEV ELiTe\_PL\_200\_100 e HEV ELiTe\_ST\_200\_100.

Os resultados são mostrados nos relatórios gerados pelo instrumento ("Result Display").

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

1) Curva de calibração	Estado
HEV Q-PCR Standards	APROVADO
2) Controlo positivo	Estado
Controlo positivo HEV	APROVADO
3) Controlo negativo	Estado
Controlo negativo HEV	APROVADO

Para cada amostra, o resultado do ensaio é automaticamente interpretado pelo sistema como estabelecido pelo algoritmo do software ELiTe InGenius e os parâmetros do Assay protocol.

Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado.

Resultado da execução da amostra	Interpretação
HEV: RNA Detected, quantity equal to XXX copies / mL or IU / mL.	<b>Foi detetado ARN HEV</b> na amostra dentro do intervalo de medição do ensaio, quantidade como mostrado.
HEV: RNA Detected, quantity below LLoQ copies / mL or IU / mL.	<b>Foi detetado ARN HEV</b> na amostra abaixo do limite inferior de quantificação do ensaio.
HEV: RNA Detected, quantity beyond ULoQ copies / mL or IU / mL.	<b>Foi detetado ARN HEV</b> na amostra além do limite superior de quantificação do ensaio.
HEV: RNA Not Detected or below the LoD copies / mL or IU / mL.	<b>Não foi detetado ARN HEV</b> na amostra. A amostra é negativa para ARN HEV ou a sua concentração está abaixo do Limite de deteção do ensaio.
Invalid - Retest Sample	<b>Resultado do ensaio não válido</b> devido a falha do Controlo Interno (extração incorreta, transferência de inibidores). O teste deve ser repetido.

**Nota:** Os resultados obtidos com sobrenadante fecal devem ser consideradas como semi-quantitativas. Estes resultados exprimem-se apenas em cópias/mL.

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

Quando o volume da eluição é suficiente, a amostra extraída pode ser novamente testada 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 reportadas como "HEV RNA Not Detected or below LoD" são adequadas para análise mas não foi possível detetar ARN de HEV. Neste caso não pode excluir-se que o ARN 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 (Result Display) por pessoal qualificado como "Administrator" ou "Analyst", seguindo as instruções na GUI. A partir da janela "Result Display" é possível imprimir e guardar os resultados da execução da amostra como "Sample Report" e "Track Report".

#### D. Elaboração do relatório do resultado da amostra

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

O "Sample Report" apresenta os detalhes de uma sessão de trabalho ordenada pela amostra selecionada (SID).

O "Track Report" apresenta os detalhes de uma sessão de trabalho pelo Rastreo selecionado.

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

### CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

#### Sensibilidade analítica: Limite de deteção (LoD)

A sensibilidade analítica deste ensaio, como sensibilidade da reação da transcrição reversa e amplificação, permite a deteção de cerca de 10 cópias de ARN em 10 µL de amostra adicionada à reação.

A sensibilidade analítica deste ensaio, como Limite de Deteção (LoD), foi definida através da associação de amostras de Plasma EDTA e amostras de sobrenadante fecal e do sistema ELiTe InGenius.

O LoD foi calculado através de testes a um painel de Plasma EDTA negativo reforçado com material de referência certificado (PEI) HEV a um título conhecido. Foram preparados seis níveis de diluição a partir de uma concentração superior ao valor LoD esperado. Cada nível de diluição foi processado em 12 réplicas no sistema ELiTe InGenius no modo "Extract + PCR". O LoD foi obtido por análise de regressão Probit dos dados com a concentração a corresponder a 95% de probabilidade de um resultado positivo. O valor do LoD foi verificado através de testes a 20 réplicas de Plasma colhido em EDTA e 20 réplicas de sobrenadante fecal reforçado com material de referência certificado HEV à concentração apresentada.

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Limite de deteção de HEV em plasma e sobrenadante fecal com o ELiTe InGenius (IU/mL)		
LoD	intervalo de 95% de confiança	
	limite inferior	limite superior
288 IU/mL	183 IU/mL	768 IU/mL

O LoD como cópias/mL para Plasma EDTA foi calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 17. A sensibilidade analítica como cópias/mL está reportada a seguir.

Limite de deteção de HEV em plasma com o ELiTe InGenius (cópias/mL)		
LoD	intervalo de 95% de confiança	
	limite inferior	limite superior
153 cópias/mL	97 cópias/mL	409 cópias/mL

#### Intervalo de medição linear

A sensibilidade analítica deste ensaio, como intervalo de medição linear, permite a quantificação desde cerca de 10.000.000 até cerca de 100 cópias por mL. O intervalo de medição linear foi determinado com recurso a um painel de amostras artificiais reforçadas com material de referência certificado HEV.

A linearidade deste ensaio, usado em associação com o ELiTe InGenius, foi verificada com recurso a um painel de diluições do ARN de HEV. O painel foi preparado através da diluição do "Quantitative Synthetic Hepatitis E virus RNA" (ATCC, código VR-3258SD) num tampão de estabilização. O painel era constituído por seis pontos de diluição (passos de diluição de 1 Registo) a partir de 10<sup>7</sup> cópias/mL a 10<sup>2</sup> cópias/mL. Cada amostra do painel foi testada em 12 réplicas através da realização de todo o procedimento de análise pelo ELiTe InGenius no modo "Extract + PCR" e por produtos ELiTechGroup S.p.A. A análise dos dados obtidos, realizada por regressão do polinómio, demonstrou que o ensaio mostra uma resposta linear para todas as diluições.

O limite inferior do intervalo de medição linear foi definido à concentração mais baixa a fornecer 100% de positividade e resultados quantitativos exatos e precisos dentro do Registo ±0,5.

O limite superior do intervalo de medição linear foi definido à concentração mais alta que fornece resultados quantitativos exatos e precisos dentro do Registo ±0,5.

O intervalo de medição linear como IU/mL para Plasma EDTA é calculado através da aplicação do fator de conversão específico reportado na página 17.

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear testado no HEV em plasma com o ELiTe InGenius	
Limite inferior	Limite superior
288 IU/mL	18.800.000 IU/mL
153 cópias/mL	10.000.000 cópias/mL

Intervalo de medição linear testado no HEV em sobrenadante fecal com o ELiTe InGenius	
Limite inferior	Limite superior
500 cópias/mL	10.000.000 cópias/mL

#### Inclusividade: Eficiência de deteção e eficiência de quantificação em diferentes genótipos/subtipos

A eficiência de deteção para diferentes genótipos foi avaliada por comparação com sequências disponíveis na base de dados de nucleótidos EBI ENA.

A análise das regiões escolhidas para a hibridização dos primários e das sondas fluorescentes no alinhamento das sequências disponíveis na base de dados para a região ORF-2 do HEV dos genótipos 1, 2, 3, 3a e 4 demonstrou a respetiva conservação e a ausência de mutações significativas.

Um estudo recente da sequência no banco de dados de nucleótidos EBI ENA identificou dois grupos de mutações significativas (por exemplo, MW355395 e MH377727) na região de hibridação da sonda. O efeito dessas mutações foi verificado e a eficiência de deteção/quantificação dessas variantes, embora menor, está dentro do intervalo de ± 0,5 Log. É possível identificar a presença destas variantes através da análise da temperatura de fusão (T<sub>m</sub>) pelo operador (ver "Problemas e Soluções").

A inclusividade do ensaio, como eficiência de deteção e quantificação em diferentes genótipos/subtipos, foi avaliada com recurso ao "1st World Health Organization International Reference Panel for Hepatitis E Virus (HEV) Genotypes for Nucleic Acid Amplification Technique (NAT)- Based Assays" (Paul Enrlch Institut, código 8578/13).

Cada amostra do painel foi testada através da realização de todo o procedimento de análise em associação com o sistema ELiTe InGenius no modo "Extract+PCR".

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Amostra	Genótipo	Média geral Registo IU/mL	Dev. Std	Medido Registo IU/mL
8567/13	1a	2,64	0,60	2,61
8568/13s	1a	4,25	0,43	4,37
8569/13	1e	3,25	0,51	3,13
8570/13	3b	4,20	0,18	4,45
8571/13	3c	3,40	0,22	3,46
8572/13	3e	3,50	0,22	3,66
8573/13	3f	3,84	0,41	3,61
8574/13s	3 (tipo coelho)	4,98	0,38	4,78
8575/13	4c	4,07	0,38	3,85
8576/13	4g	3,77	0,38	3,36
8577/13s	2a	5,42	0,49	4,96

Todas as amostras foram detetadas corretamente. As amostras foram quantificadas no intervalo definido pelo Estudo colaborativo da OMS ± 1 SD, com exceção das 8570/13, 8576/13 e 8577/13s que, contudo, ficaram dentro do Registo ± 0,5.

#### Marcadores potencialmente interferentes

A potencial reatividade cruzada com outros organismos não pretendidos do ensaio foi avaliada pela análise *in silico* das sequências disponíveis na base de dados de nucleótidos EBI ENA.

**Kit HEV ELITe MGB®**  
reagentes para transcrição reversa de ARN e amplificação em tempo real de cADN

REF RTS130ING

As regiões escolhidas para a hibridização dos primários e as sondas fluorescentes foram verificadas no alinhamento das sequências de outros vírus e bactérias. As regiões de hibridização revelaram a ausência de homologies significativas e não indicaram uma potencial interferência.

A ausência de reatividade cruzada com outros organismos que podem ser encontrados nas amostras clínicas de Plasma também foi verificada através de testes a um painel de materiais de referência certificados.

As amostras de ADN ou ARN genômico de diferentes organismos de potencial reatividade cruzada (ATCC, NIBSC e Qnostics) foram analisadas em três réplicas em associação com o sistema ELITe InGenius no modo "PCR Only".

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Organismos de potencial reatividade cruzada		
Organismo	Estirpe	Resultado
CMV	AD-169	Sem reatividade cruzada
HSV-1	Mclntyre	Sem reatividade cruzada
HSV-2	G	Sem reatividade cruzada
EV	Enterovírus 71	Sem reatividade cruzada
EBV	B95-8	Sem reatividade cruzada
BKV	1b-2	Sem reatividade cruzada
JCV	1A	Sem reatividade cruzada
WNV	NY99	Sem reatividade cruzada

Todos os organismos com potencial de reatividade cruzada foram negativos para o alvo quando testados pelo Kit HEV ELITe MGB®.

A ausência de interferência por outros organismos que podem ser encontrados nas amostras clínicas de Plasma também foi verificada através de testes ao painel de materiais de referência certificados.

As amostras de ADN ou ARN genômico de diferentes organismos de potencial reatividade cruzada (ATCC, NIBSC e Qnostics) foram reforçadas com material de referência certificado HEV (ATCC) a uma baixa concentração (cerca de 10 cópias/reação). As amostras foram analisadas em três réplicas em associação com o sistema ELITe InGenius no modo "PCR Only".

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Organismos potencialmente interferentes		
Organismo	Estirpe	Resultado
CMV	AD-169	Sem interferência
HSV-1	Mclntyre	Sem interferência
HSV-2	G	Sem interferência
EV	Enterovírus 71	Sem interferência
EBV	B95-8	Sem interferência
BKV	1b-2	Sem interferência
JCV	1A	Sem interferência
WNV	NY99	Sem interferência

Nenhum dos potenciais organismos interferentes afetou a amplificação do alvo quando testados pelo Kit HEV ELITe MGB®.

#### Substâncias potencialmente interferentes

O possível efeito de substâncias interferentes foi avaliado através da análise do painel "AcroMatrix® Inhibition Panel" (Life Technologies Inc.) contendo substâncias endógenas, resultantes de hemólise, icterícia e lipemia, e substâncias exógenas, anticoagulantes EDTA e Heparina.

As amostras do painel de inibição foram reforçadas com material de referência certificado (PEI) HEV a uma concentração equivalente a aproximadamente 3X o LoD. As amostras foram processadas em três réplicas no sistema ELITe InGenius no modo "Extract + PCR".

Os valores Ct do alvo e o Controlo Interno (amostras de referência e de teste) foram usados para calcular a percentagem do Coeficiente de Variabilidade (%CV) para avaliar a possível interferência.

**Kit HEV ELITe MGB®**  
reagentes para transcrição reversa de ARN e amplificação em tempo real de cADN

REF RTS130ING

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Substâncias potencialmente interferentes			
Amostra	Pos./Rep.	%CV HEV Ct	%CV CI Ct
Plasma EDTA	3 / 3	2,092	3,434
Sangue hemolítico baixo	3 / 3	1,134	0,842
Sangue hemolítico médio	3 / 3	1,209	0,590
Sangue hemolítico alto	3 / 3	1,768	0,983
Plasma heparinizado	3 / 3	1,775	3,731
Plasma lipémico	3 / 3	1,070	2,653
Plasma icterício	3 / 3	1,313	0,797

Todas as amostras tiveram resultado positivo para o alvo de interesse, como esperado. A percentagem %CV dos valores Ct foi inferior a 4%. Verificou-se que nenhuma das substâncias testada nas concentrações testadas interferiu com a deteção do alvo pelo HEV ELITe MGB® Kit.

#### Capacidade de repetição

A capacidade de repetição dos resultados do ensaio em associação com o sistema ELITe InGenius foi testada através da análise de um painel de amostras de plasma EDTA. O painel incluiu uma amostra negativa e três amostras reforçadas com material de referência certificado (PEI) HEV a uma concentração de 0,5X o LoD (cerca de 144 IU/mL), 1,5X o LoD (cerca de 431 IU/mL) e 3X o LoD (cerca de 861 IU/mL).

A Capacidade de repetição foi obtida através da análise de amostras de painel em três réplicas, em duas execuções por dia, com o mesmo lote de produto. Foram usados três lotes de produtos em três dias diferentes no mesmo instrumento pelo mesmo operador. As amostras foram processadas no sistema ELITe InGenius no modo "Extract + PCR".

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							
Amostra	Pos./Neg.	HEV			Controlo Interno		
		Ct média	SD	% CV	Ct média	SD	% CV
Negativo	0 / 6	N/A	N/A	N/A	30,27	0,27	0,90
0,5X o LoD	5 / 6	39,80	0,57	1,42			
1,5X o LoD	6 / 6	38,77	0,89	2,28			
3X o LoD	6 / 6	37,75	0,82	2,17			

Capacidade de repetição inter-lote							
Amostra	Pos./Neg.	HEV			Controlo Interno		
		Ct média	SD	% CV	Ct média	SD	% CV
Negativo	0 / 18	N/A	N/A	N/A	29,95	0,37	1,23
0,5X o LoD	16 / 18	39,62	0,71	1,80			
1,5X o LoD	18 / 18	38,46	0,95	2,47			
3X o LoD	18 / 18	37,55	0,75	2,01			

No teste da Capacidade de repetição, o ensaio detetou o HEV alvo como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores Ct que não excederam 3% para HEV e 2% para o Controlo Interno.

#### Capacidade de reprodução

A capacidade de reprodução dos resultados do ensaio em associação com o sistema ELITe InGenius foi testada através da análise de um painel de amostras de plasma EDTA. O painel incluiu uma amostra negativa e três amostras reforçadas com material de referência certificado (PEI) HEV a uma concentração de 0,5X o LoD (cerca de 144 IU/mL), 1,5X o LoD (cerca de 431 IU/mL) e 3X o LoD (cerca de 861 IU/mL).

**Kit HEV ELiTe MGB®**  
reagentes para transcrição reversa de ARN e amplificação em tempo real de cADN

REF RTS130ING

A Capacidade de reprodução foi obtida através da análise de amostras de painel em três réplicas, em duas execuções por dia. Foram usados três lotes diferentes do produto em três dias diferentes, em três instrumentos diferentes e por três operadores diferentes. As amostras foram processadas no sistema ELiTe InGenius no modo "Extract + 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 nas tabelas seguintes um resumo dos resultados.

Capacidade de reprodução					Controlo Interno		
Amostra	Pos./Neg.	HEV			Ct média	SD	% CV
		Ct média	SD	% CV			
Negativo	0 / 18	N/A	N/A	N/A	30,04	0,33	1,10
0,5X o LoD	14 / 18	39,43	0,66	1,68			
1,5X o LoD	18 / 18	38,24	0,60	1,58			
3X o LoD	18 / 18	36,90	0,40	1,07			

No teste da Capacidade de reprodução, o ensaio detetou o HEV alvo como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores Ct que não excederam 2 % para HEV e para o Controlo Interno.

**Fator de conversão para unidades internacionais**

O fator de conversão, para exprimir os resultados quantitativos em Unidades internacionais (IU)/mL a partir de cópias/mL, foi calculado com recurso a um painel de quatro diluições (Registo 0,5 entre diluições) domaterial de referência calibrado ("1st World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays", (PEI, Alemanha, código 6329/10) em Plasma colhido em EDTA com teste negativo para ARN de HEV.

Cada ponto do painel foi testado em 9 réplicas com três lotes de produto diferentes, em três instrumentos diferentes, em três dias diferentes. As amostras foram processadas no sistema ELiTe InGenius no modo "Extract+ PCR".

É mostrado na tabela seguinte um resumo dos resultados.

Fator de conversão para unidades internacionais com o ELiTe InGenius	
Plasma EDTA	Fc = 1,88 IU/cópia

O fator de conversão foi calculado apenas para amostras de Plasma. Como os resultados com o sobrenadante fecal são apenas semi-quantitativos, não foi calculado nenhum fator de conversão para esta matriz.

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

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas negativas, foi avaliada através da análise de 30 amostras de plasma e 30 amostras de sobrenadante fecal.

As amostras eram alegadamente negativas e foram testadas pelo ensaio em associação com o sistema ELiTe InGenius no modo "Extração + PCR".

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo	inválido
Plasma EDTA negativo para HEV	30	0	30	0
Sobrenadante fecal negativo para HEV	30	0	30	0

Neste teste, todas as amostras foram confirmadas válidas e negativas. Neste teste, a especificidade do ensaio foi igual a 100%.

**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 30 amostras de plasma e 30 amostras de sobrenadante fecal, reforçadas com material de referência HEV.

As amostras negativas usadas no teste de especificidade de diagnóstico foram reforçadas com material de referência HEV (PEI) em três concentrações diferentes (3x LoD, 10x LoD e 30x LoD). As amostras reforçadas foram testadas pelo ensaio em associação com o sistema ELiTe InGenius no modo "Extract + PCR".

**Kit HEV ELiTe MGB®**  
reagentes para transcrição reversa de ARN e amplificação em tempo real de cADN

REF RTS130ING

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo	inválido
Plasma EDTA reforçado para HEV	30	30	0	0
Sobrenadante fecal reforçado para HEV	30	29	1	0

No teste, 30 em 30 amostras reforçadas de plasma foram confirmadas positivas e 29 em 30 amostras reforçadas de sobrenadante fecal foram confirmadas positivas. Uma amostra reforçada a 3X o LoD forneceu um resultado negativo divergente.

Neste teste, a sensibilidade de diagnóstico do ensaio para plasma foi igual a 100% e a sensibilidade de diagnóstico do ensaio para sobrenadante fecal foi igual a 96,7%.

**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 " HEV ELiTe MGB ® Kit ", FTP RTS130ING.

**REFERÊNCIAS**

J. J. Germer et al. (2017) *J Clin Microbiology* 55 (5): 1478 – 1487

E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

**LIMITAÇÕES AO PROCEDIMENTO**

Use este produto apenas com as seguintes amostras clínicas: plasma colhido em EDTA, sobrenadante fecal.

Não use este produto com amostras de plasma colhido em heparina: a heparina inibe a reação de amplificação de ácidos nucleicos e causa resultados inválidos.

Não use este produto com amostras que contenham demasiada matriz fecal: as amostras com elevada turvação inibem a reação de amplificação de ácidos nucleicos e podem causar resultados inválidos.

Não use este produto com quantidade de ADN ou ARN superior a 1 µg: uma elevada quantidade de ácidos nucleicos pode inibir a transcrição reversa e as reações de amplificação e pode causar resultados inválidos.

Neste momento não existem dados disponíveis relativos ao desempenho do produto com as seguintes amostras clínicas: sangue completo colhido em EDTA.

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, dos controlos positivos e dos mesmos produtos de amplificação. Contaminações cruzadas causadas por falsos resultados positivos. O formato do produto é capaz de limitar contaminações cruzadas. No entanto, as contaminações cruzadas podem ser evitadas simplesmente através de boas práticas laboratoriais e do cumprimento destas instruções de utilização.

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

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

Este produto requer o uso de vestuário especial e instrumentos específicos para preparação da sessão de trabalho, 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 ARN alvo não foi detetado no ARN extraído da amostra; mas não pode negligenciar-se o facto de o ARN alvo ter um título mais baixo que o limite de deteção do produto (Ver Características de desempenho). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

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

Possíveis polimorfismos na região do ARN alvo abrangidos pelos primários do produto e as sondas podem prejudicar a deteção e quantificação do ARN alvo.

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, este risco residual pode contribuir para decisões erradas com potenciais efeitos perigosos para o doente.

### RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

#### Reação do Q-PCR Standard ou reação de controlo positivo inválida Curva standard inválida

Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da mistura de reação completa, dos Q-PCR Standards e do controlo positivo. Verifique os volumes da mistura de reação completa, dos Q-PCR Standards e do controlo positivo.
Erro na preparação da mistura de reação completa.	Verifique os volumes dos reagentes usados durante a preparação da mistura de reação completa.
Degradação da mistura de reação completa ou dos seus componentes.	Não use a mistura de reação completa durante mais de três sessões (7 horas na área de inventário). Não deixe a mistura de reação completa à temperatura ambiente durante mais de 30 minutos. Prepare novamente a mistura de reação completa. Utilize uma nova alíquota de componentes.
Degradação dos Q-PCR Standards ou do controlo positivo.	Use novas alíquotas dos Q-PCR Standards ou do controlo positivo.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

#### Reação de Controlo negativo inválida

Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da mistura de reação completa e do controlo negativo. Verifique os volumes da mistura de reação completa e do controlo negativo.
Contaminação da mistura de reação completa ou dos respetivos componentes.	Prepare novamente a mistura de reação completa. Utilize uma nova alíquota de componentes.
Contaminação do controlo negativo.	Utilize uma nova alíquota de água de qualidade molecular.
Contaminação da Extraction Area, de Rack ou do Bloco de Inventory Area.	Limpe as superfícies com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos de ensaio e as pontas em utilização.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

#### Reação da amostra inválida

Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da mistura de reação completa e da amostra. Verifique os volumes da mistura de reação completa e da amostra.
Erro na preparação da mistura de reação completa.	Verifique os volumes dos reagentes usados durante a preparação da mistura de reação completa.
Degradação da mistura de reação completa ou dos seus componentes.	Não use a mistura de reação completa durante mais de três sessões (7 horas na área de inventário). Não deixe a mistura de reação completa à temperatura ambiente durante mais de 30 minutos. Não deixe a RT EnzymeMix a temperaturas superiores a -20 °C durante mais de 10 minutos. Prepare novamente a mistura de reação completa. Utilize uma nova alíquota de componentes.
Degradação do modelo de Controlo Interno.	Utilize uma nova alíquota 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 com uma diluição 1:2 em água de qualidade para biologia molecular da amostra principal numa sessão "Extract + PCR".
Degradação da amostra.	Repita a extração com uma nova alíquota da amostra.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

#### Presença de curva de dissociação anormal

Causas possíveis	Soluções
Ausência de um pico definido. Pico definido, mas diferente de outras amostras e padrões ou controle positivo.	Verifique se o Ct do detector FAM é inferior a 30. Grandes quantidades de produto de amplificação presentes no final da reação podem interferir na análise da curva de dissociação. Repetir a amplificação da amostra para confirmar a presença de um DNA alvo com uma possível mutação. Para confirmar a presença de uma mutação, o DNA alvo presente na amostra deve ser sequenciado.

#### Erro 30103

Causas possíveis	Soluções
Amostra com concentração alvo demasiado alta.	Se for observada uma amplificação significativa no lote PCR: - selecione o rastreio relacionado com a amostra e aprove manualmente o resultado. Se for necessário um valor Ct: - repita a amplificação com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR Only" ou - repita a extração com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular da amostra principal numa sessão "Extract + PCR".

**Kit HEV ELITE MGB®**  
reagentes para transcrição reversa de ARN e  
amplificação em tempo real de cADN

**REF** RTS130ING

**Kit HEV ELITE MGB®**  
reagentes para transcrição reversa de ARN e  
amplificação em tempo real de cADN

**REF** RTS130ING

Erro TH	
Causas possíveis	Soluções
Amostra com concentração alvo demasiado alta.	Se for observada uma amplificação significativa no traçado PCR com linha de base negativa: - repita a amplificação com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR Only" ou - repita a extração com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular da amostra principal numa sessão "Extract + PCR".

#### NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA

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

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

#### SÍMBOLOS

**REF**

Número do catálogo.



Limite máximo da temperatura.

**LOT**

Código do lote.



Usar até (último dia do mês).



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.

**CONT**

Conteúdo.



Manter afastado da luz solar.



Fabricante.

ELITE MGB®, o logótipo ELITE MGB® e o ELITE InGenius® são marcas comerciais registadas do ELITechGroup na União Europeia.