



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

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

NOTICE of CHANGE dated 07/02/2025

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«Bordetella ELITE MGB[®] Kit» Ref. RTS140ING

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

Insertion of interpretative sentence relating to IS481 in paragraphs:

- “Validation of Sample results”
- “Potential interfering markers (cross-reactivity)”
- “Potential interfering markers (inhibition)”
- “Procedure limitations”

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



DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS

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

REF RTS140ING



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 6
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	página 13
REFERÊNCIAS	página 18
LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	página 18
RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	página 20
SÍMBOLOS	página 22
NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	página 23

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto «Kit Bordetella ELITE MGB®» faz parte de um ensaio qualitativo de amplificação de ácidos nucleicos multiplex para a deteção e identificação do ADN de *Bordetella pertussis* (BP), *Bordetella parapertussis* (BPP) e *Bordetella holmesii* (BH) em amostras clínicas.

O ensaio foi validado em associação com o sistema ELITE InGenius® a partir de aspirado nasofaríngeo.

O produto está previsto para utilização como auxiliar no diagnóstico de infeções respiratórias *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e *Bordetella holmesii*, em conjunto com os dados clínicos do doente e outros resultados de testes laboratoriais.

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

REF RTS140ING

PRINCÍPIOS DO ENSAIO

O ensaio consiste numa reação multiplex de amplificação em tempo real realizada com o ELITE InGenius®, um sistema automático e integrado para extração, amplificação e deteção de ácidos nucleicos e interpretação de resultados.

A partir do ADN extraído de cada amostra sujeita a teste, são realizadas diferentes reações de amplificação pela mistura BORD PCR na Cassete PCR para amplificar os seguintes alvos:

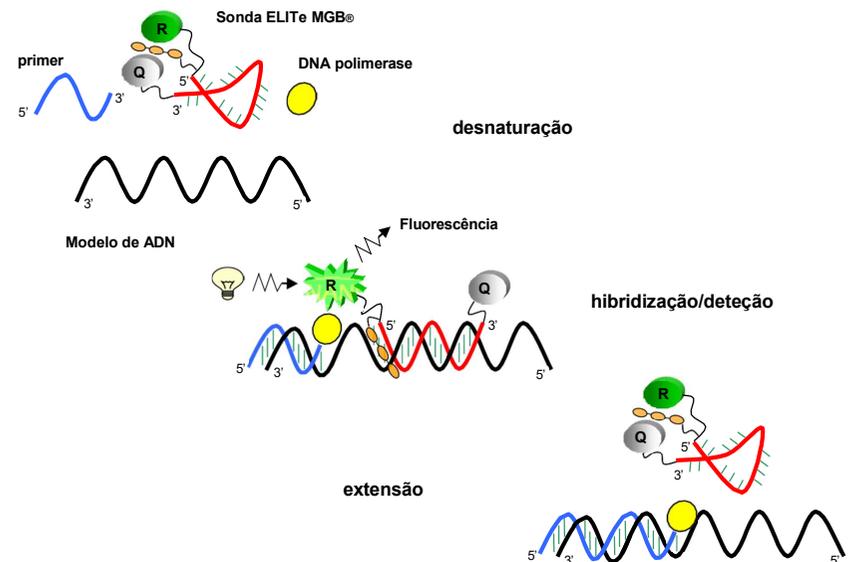
- sequência repetida IS481 de *B. pertussis* e *B. holmesii*, detetada pela sonda específica IS481 (Canal 1),
- gene ptxA de *B. pertussis*, detetado pela sonda específica BP (Canal 5),
- gene recA de *B. holmesii*, detetado pela sonda específica BH (Canal 6),
- sequência repetida IS1001 de *B. parapertussis*, detetada pela sonda específica BPP (Canal 4).

A mistura BORD PCR também amplifica o Controlo Interno da extração e inibição com base numa sequência artificial (IC2) e detetado pela sonda específica CI (Canal 2).

As sondas com a tecnologia ELITE MGB® são ativadas quando hibridizam com o produto específico da reação de amplificação. A emissão de fluorescência é medida e registada pelo instrumento. No final do ciclo de amplificação, os diagramas da fluorescência são analisados para identificar os ciclos do limiar (Ct). A interpretação do resultado permite detetar a presença dos patogénicos de interesse na amostra inicial.

O ensaio foi validado 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 resumidamente 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.



Kit Bordetella ELITE MGB®

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS140ING

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto «**Kit Bordetella ELITE MGB®**» fornece uma mistura completa e pronta a usar para amplificação em tempo real, **mistura BORD PCR**, aliquotada em oito tubos de teste. Cada tubo contém **280 µL** de solução, suficiente para **12 testes** em condições ideais de consumo do reagente (pelo menos 2 testes por sessão) quando usado com o sistema **ELITE InGenius**.

A Mistura BORD PCR contém os primários e sonda específicos para:

- a sequência repetida **IS481** de *B. pertussis* e *B. holmesii*. A sonda **IS481** (Canal 1) é etiquetada com fluoróforo FAM, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma humidade não fluorescente,
- o gene **ptxA** de *B. pertussis*. A sonda **BP** (Canal 5) é etiquetada com fluoróforo AP639, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma humidade não fluorescente,
- o gene **recA** de *B. holmesii*. A sonda **BH** (Canal 6) é etiquetada com fluoróforo AP690, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma humidade não fluorescente,
- a sequência repetida **IS1001** de *B. paraptussis*. A sonda **BPP** (Canal 4) é etiquetada com fluoróforo AP593, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma humidade não fluorescente,
- a sequência artificial **IC2** do Internal Control (CI) exógeno. A sonda **CI** (Canal 2) é etiquetada com fluoróforo AP525, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma humidade não fluorescente,

A Mistura BORD PCR contém o tampão, o cloreto de magnésio, os trifosfatos nucleotídicos, os estabilizadores e a enzima de polimerase de ADN Taq com ativação térmica (arranque a quente).

O produto é suficiente para **96 testes em associação com o sistema ELITE InGenius**, incluindo comandos.

MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
Mistura BORD PCR	Mistura de reação completa Tampa BRANCA	8 x 280 µL	-

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- Câmara de fluxo laminar.
- Luvas de nitrilo sem pó descartáveis ou material semelhante.
- Misturador de vórtice.
- Microcentrífuga de bancada (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas e pontas esterilizadas com filtro de aerossóis ou pontas esterilizadas de deslocação positiva (2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Água de grau de biologia molecular.

OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

Os reagentes para extração do ADN das amostras a serem analisadas, o Controlo Interno da extração e inibição, o controlo positivo de amplificação e os consumíveis **não** estão incluídos neste produto.

Para a extração de ADN automática, a amplificação em tempo real e a interpretação dos resultados das amostras, são necessários 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 Positive Control «**BORD ELITE_PC**»,
- parâmetros para amplificação de Negative Control «**BORD ELITE_PC**»,
- Parâmetros para amostras de aspirado nasofaríngeo a ser analisado «**BORD ELITE_NPA_200_100**».

Kit Bordetella ELITE MGB®

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS140ING

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, ref. TF-350-L-R-S),
- caixas «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., ref. F2102-000).

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

Como modelo do controlo positivo da amplificação, é necessário o produto específico «**Controlo positivo Bordetella - ELITE**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR140ING). Esta é uma solução estabilizada contendo ADNs plasmídeos.

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 resíduos devem ser manuseados e eliminados em conformidade com as normas de segurança adequadas. Os materiais combustíveis descartáveis devem ser incinerados. Os desperdícios líquidos que contenham ácidos ou bases devem ser neutralizados antes da eliminação.

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

Nunca deve pipetar soluções com a boca.

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

Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.

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

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

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

Não utilize o produto após a data de validade indicada.

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

Não use reagentes de lotes diferentes.

Não use reagentes de outros fabricantes.

Avisos e precauções para biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular 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. É necessário ter disponíveis áreas separadas para o teste de biologia molecular e o teste de cultura microbiológica. Nunca manuseie a cultura líquida ou sólida na área designada para as reações de extração/amplificação.

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

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

REF RTS140ING

As PCR Cassettes devem ser manuseadas de modo a reduzir, tanto quanto possível, a difusão do produto de amplificação para o ambiente, para evitar a contaminação da amostra e do reagente.

Avisos e precauções específicos para os componentes

A **Mistura PCR** deve ser guardada a -20 °C num local escuro.

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

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser utilizado com as seguintes amostras clínicas:

Aspirado nasofaríngeo

As amostras de aspirado nasofaríngeo para extração de ácido nucleico devem ser recolhidas de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas e armazenadas à temperatura ambiente (+18/+25 °C) durante o máximo de dois dias ou a +2/+8 °C durante um máximo de sete dias; caso contrário, deverão ser congeladas e guardadas a -20 °C durante um máximo de um mês 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.

Antes da análise com este produto, devem ser transferidos 0,2 mL da amostra para o Tubo de Sonicação fornecido com o «ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set».

Nota: Para realizar a extração de ADN do aspirado nasofaríngeo pelo sistema ELITe InGenius e o software ELITe InGenius versão 1.3 (ou versões mais recentes), use o Protocolo do ensaio **BORD ELITe_NPA_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.

Substâncias interferentes

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

Controlos de amplificação

Antes da análise de qualquer amostra, é absolutamente obrigatório criar e aprovar os controlos de amplificação para o lote do reagente de amplificação que será usado nos testes:

- como Positive Control da amplificação, use o reagente **Controlo positivo Bordetella – ELITe** (não fornecido com este kit) em associação com o Protocolo do ensaio **BORD ELITe_PC**,
- como Controlo negativo da amplificação, use água de qualidade para biologia molecular (não fornecida com este kit) em associação com o Protocolo do ensaio **BORD ELITe_NC**.

Nota: O sistema **ELITe InGenius** requer resultados aprovados e válidos dos controlos da amplificação para cada lote de reagente de amplificação guardado na respetiva base de dados.

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 em utilização.

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

- for iniciado um novo lote de reagentes de amplificação,
- os resultados dos controlos da qualidade (ver o parágrafo seguinte) se encontrarem fora da especificação,
- for realizado qualquer serviço de manutenção significativo 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.

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

REF RTS140ING

PROCEDIMENTO

O procedimento para utilização do **Kit Bordetella ELITe MGB®** 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 instrumento **ELITe InGenius** e selecionar o modo de início de sessão "CLOSED" (Fechado),
- verificar que os controlos da amplificação (Controls, BORD Positive Control, BORD Negative Control) foram executados em associação com o lote do reagente de amplificação a ser usado e que os resultados são aprovados e válidos (Estado). Se não existirem resultados de controlo da amplificação aprovados ou válidos, crie os mesmos 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.

O Protocolo de ensaio disponível para teste da amostra com o produto **Kit Bordetella ELITe MGB®** está descrito na tabela seguinte:

Protocolo de ensaio para o Kit Bordetella ELITe MGB®			
Nome	Matriz	Relatório	Características
BORD ELITe_NPA_200_100	Aspirado nasofaríngeo	Positivo/Negativo	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

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

Preparação da sessão

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

- Execução integrada (Extract + PCR) (Extração + PCR),
- Execução de amplificação (PCR Only) (apenas PCR),
- Execução de amplificação para Positive Control e Negative Control (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.

Estão descritos a seguir 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:

1. Descongele os tubos da BORD PCR Mix para a sessão. Cada tubo é suficiente para 12 reações em condições ideais de consumo do reagente (pelo menos 2 testes por sessão). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Descongele a BORD PCR Mix num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

2. Descongele os tubos CPE 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 "ID da amostra" (SID) digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
6. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (por ex., BORD ELITe_NPA_200_100).
7. Certifique-se de que o "Protocol" apresentado é: "Extract + PCR"(Extraction + PCR).
8. Selecione "Tubo de extração" na coluna "Posição da amostra".
9. Selecione "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue a CPE e a BORD PCR Mix no "Inventory Block" selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
12. Carregue as "PCR Cassettes", 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. Selecione "Next" para continuar a preparação.
13. Feche a porta do instrumento.
14. 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 "Tubo de eluição" deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 °C durante um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da execução, as PCR Cassettes 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 PCR Mix pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 7 sessões de trabalho de 3 horas cada.

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 os tubos da BORD PCR Mix para a sessão. Cada tubo é suficiente para 12 reações em condições ideais de consumo do reagente (pelo menos 2 testes por sessão). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Descongele a BORD 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., BORD ELITe_NPA_200_100).
6. Selecione "PCR Only" (apenas PCR) na coluna "Protocol".
7. Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" é "Elution Tube (fila inferior)". Selecione "Next" para continuar a preparação.
8. Carregue a BORD PCR Mix no "Inventory Block" selecionado seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue as "PCR Cassettes" e as amostras de Ácido nucleico extraídas seguindo as instruções na GUI. Selecione "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 "Tubo de eluição" deve ser removida do instrumento, tapada e guardada a -20 °C durante um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

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

Nota: A PCR Mix pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 7 sessões de trabalho de 3 horas cada.

C. Execução de amplificação para Controlo Positivo e Controlo Negativo

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

- Descongele os tubos da BORD PCR Mix para a sessão. Cada tubo é suficiente para preparar 12 reações em condições ideais de consumo do reagente (pelo menos 2 testes por sessão). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Descongele a BORD PCR Mix num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

- Descongele o tubo BORD Positive Control para a sessão. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. 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 ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
- 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.
- No Rastreo de interesse, selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay".
- Para o controlo positivo, selecione BORD ELITe_PC na coluna "Ensaio" e preencha o número do lote e a data de validade do Controlo positivo BORD.
- Para o controlo negativo, selecione BORD ELITe_NC e preencha o número do lote e a data de validade da água de qualidade para biologia molecular.
- Selecione "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a BORD PCR Mix no "Inventory Block" selecionado seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
- Carregue/verifique os racks para pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
- Carregue as "PCR Cassettes", o tubo BORD Positive Control e o tubo de Negative Control seguindo as instruções na GUI. Selecione "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 deve ser removido do instrumento, tapado, identificado e guardado a -20 °C. Evite derramar o controlo. O restante Negative Control deve ser eliminado.

Nota: No final da execução, as PCR Cassettes 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 PCR Mix pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de 7 sessões de trabalho de 3 horas cada.

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 sistema ELITe InGenius gera os resultados com o produto Kit Bordetella ELITe MGB® através do seguinte procedimento:

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

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

Os sinais de fluorescência emitidos pelas sondas dos genes patogénicos (canais IS481, BP, BH e BPP) na reação de amplificação de Positive Control e Negative Control são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos nos Protocolo de ensaio "BORD ELITe_PC" e "BORD ELITe_NC".

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

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

Os resultados das execuções de amplificação de Positive Control e Negative Control são usados pelo software do instrumento para preparar os "Control Charts" para monitorizar os desempenhos do passo de amplificação. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

Nota: Se o resultado do Positive Control ou Negative Control 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 Positive Control ou Negative Control da amplificação.

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

B. Validação dos resultados da amostra

Os sinais de fluorescência emitidos pelas sondas dos genes patogénicos (canais IS481, BP, BH e BPP) e pela sonda do Controlo Interno (canal CI) nas reações de amplificação da amostra são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos nos Protocolos de ensaio BORD ELITe_NPA_200_100.

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

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

1) Positive Control	Estado
BORD Positive Control	APROVADO
2) Negative Control	Estado
BORD Negative Control	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 protocolo do ensaio.

Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado. Para cada amostra o sistema comunica uma combinação das seguintes mensagens a especificar se os ADN dos patogénicos foram detetados ou não detetados.

Resultado da execução da amostra	Interpretação
IS481: ADN detetado.	O ADN de <i>B. pertussis</i> ou <i>B. holmesii</i> (IS481) foi detetado na amostra. Nota: quando for detetado o ADN IS481, também pode ser tipado o ADN de <i>B. pertussis</i> (BP) ou <i>B. holmesii</i> (BH).
IS481: ADN detetado de outras espécies relacionadas.	ADN do tipo IS481 de um organismo não intencional foi detetado na amostra.
IS481: ADN não detetado ou inferior ao LoD.	O ADN de <i>B. pertussis</i> e <i>B. holmesii</i> (IS481) não foi detetado na amostra. A amostra é negativa para estes patogénicos ou as respetivas concentrações estão abaixo do Limite de deteção do ensaio.
BP: tipagem positiva.	O ADN de <i>B. pertussis</i> foi detetado na amostra. Nota: quando é detetado o BP alvo, o IS481 alvo também deve ser detetado.
BP: tipagem não exequível.	Este alvo específico para <i>B. pertussis</i> não foi detetado na amostra. Verifique também os resultados do alvo IS481.
BH: tipagem positiva.	O ADN de <i>B. holmesii</i> foi detetado na amostra. Nota: quando é detetado o BH alvo, o IS481 alvo também deve ser detetado.
BH: tipagem não exequível.	Este alvo específico para <i>B. holmesii</i> não foi detetado na amostra. Verifique também os resultados do alvo IS481.
BPP: ADN detetado.	O ADN de <i>B. parapertussis</i> foi detetado na amostra.
BPP: ADN não detetado ou inferior ao LoD.	O ADN de <i>B. parapertussis</i> não foi detetado na amostra. A amostra é negativa para este patogénico ou a sua concentração está abaixo do Limite de deteção do ensaio.
Invlálido - Voltar a testar a amostra.	Resultado do ensaio inválido causado por falha do Controlo Interno devido a extração incorreta, transferência de inibidores. O teste deve ser repetido.

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

Quando o volume da eluição é suficiente, a amostra extraída pode ser novamente testada 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".

Amostras reportadas como "IS481: ADN não detetado ou inferior ao LoD" ou "ADN BPP não detetado ou inferior ao LoD" são adequadas para análise mas não foi possível detetar os ADN alvos. Neste caso não pode excluir-se que os ADN alvo estão presentes a uma concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver "Características de desempenho").

Amostras reportadas como "IS481: ADN detetado de outras espécies relacionadas" são adequadas para análise e o ADN do tipo IS481 de um organismo não intencional foi detetado na amostra. Neste caso, a amostra é considerada positiva para o alvo IS481, mas o ADN alvo específico de *B. holmesii* (BH) ou o ADN alvo específico de *B. pertussis* (BP) não foram detetados na amostra.

Quando é detetado ADN do gene multicópia IS481, em amostras positivas baixas de ADN do alvo específico de *B. pertussis* (BP) ou ADN do alvo específico de *B. holmesii* (BH) pode não ser detetado devido a diferenças no número de cópias dos genes do alvo específico (por ex., o promotor do gene ptxA e do gene recA estão presentes numa única cópia no BP e BH, respetivamente). No entanto, a amostra é positiva para *B. pertussis* ou para *B. holmesii*, mas não será possível realizar a identificação.

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".

C. Exportação do resultado da amostra

Os resultados da amostra são guardados na base de dados e podem ser 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 o "Track Report" podem ser impressos e assinados por pessoal autorizado.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Limite de branco (LoB)

O Limite de branco (LoB) do Kit Bordetella ELITE MGB® foi definido em associação com amostras de aspirado nasofaríngeo (NPA) e o sistema ELITE InGenius.

O LoB foi verificado através de testes a um painel de 60 amostras clínicas NPA com teste negativo para o alvo IS481 (*B. pertussis* e *B. holmesii*) e para IS1001 (*B. parapertussis*) pelo método cultural e um ensaio comercial CE IVD num laboratório externo. Cada amostra foi processada no sistema ELITE InGenius no modo "Extração + PCR". Devido à elevada sensibilidade analítica, o LoB foi definido através da aplicação de um corte Ct igual a 40 para o alvo IS481 (*B. pertussis* e *B. holmesii*) e para o alvo BPP (IS1001, *B. parapertussis*) para obter os 95% de negativos.

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

B. pertussis / B. holmesii (alvo IS481)				
Matriz	N	Positivo	Negativo	% negatividade
Aspirados nasofaríngeos negativos	60	3	57	95
B. parapertussis (BPP alvo)				
Matriz	N	Positivo	Negativo	% negatividade
Aspirados nasofaríngeos negativos	60	1	59	98

As amostras que deram resultado positivo em associação com o Kit Bordetella ELITE MGB® e o sistema ELITE InGenius apresentaram valores de Ct elevados (entre 37 e 40) e, por isso, tinham uma concentração muito baixa.

Limite de deteção (LoD)

O Limite de deteção (LoD) do Kit Bordetella ELITE MGB® foi definido em associação com amostras de aspirado nasofaríngeo (NPA) e o sistema ELITE InGenius.

O LoD foi calculado através de testes a um painel de amostras NPA negativas reforçadas com um material de referência de *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. holmesii* (DMSZ, Alemanha) 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 calculado por análise de regressão Probit dos dados com a concentração a corresponder a 95% de probabilidade de um resultado positivo.

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Alvo	LoD (CFU / mL)	Limites de intervalo de 95% de confiança	
		Limite inferior	Limite superior
<i>B. pertussis</i> (alvo IS481)	12	7	58
<i>B. parapertussis</i> (alvo IS1001)	11	6	19
<i>B. holmesii</i> (alvo IS481)	12	5	34

Eficiência da deteção (inclusividade)

A eficiência de deteção de diferentes estirpes ou isolados de *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. holmesii* do produto Kit Bordetella ELITE MGB® foi avaliada por meio da análise *in silico* de sequências disponíveis na base de dados de nucleótidos EBI ENA.

As regiões escolhidas para a hibridização dos primários e das sondas fluorescentes foram verificadas no alinhamento das sequências da sequência repetida IS481 (*B. pertussis* e *B. holmesii*), o gene *ptxA* (*B. pertussis*), o gene *recA* (*B. holmesii*), a sequência repetida IS1001 (*B. parapertussis*). As regiões de hibridização mostraram conservação da sequência e a ausência de mutações significativas, pelo que é de esperar uma amplificação eficiente de todos os organismos analisados.

A eficiência de deteção de diferentes estirpes ou isolados de *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. holmesii* também foi avaliada através da análise de um painel de materiais certificados a uma baixa concentração (cerca de 100 cópias/reacção).

Amostras de ADN genómico certificado de Vircell Microbiologists (Espanha), DSMZ (Alemanha) e ATCC (EUA), foram diluídas e analisadas em triplicado em associação com o sistema ELITE InGenius no modo "Apenas PCR".

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Inclusividade		
Organismos	Estirpe	Resultado
<i>B. pertussis</i>	Vircell, estirpe F	IS481 detetado, tipagem positiva BP
<i>B. parapertussis</i>	Vircell, CDC F5101	BPP detetado
<i>B. holmesii</i>	Vircell, isolado clínico	IS481 detetado, tipagem positiva BH
<i>B. pertussis</i>	DSMZ, isolado clínico	IS481 detetado, tipagem positiva BP
<i>B. parapertussis</i>	DSMZ, isolado clínico	BPP detetado
<i>B. holmesii</i>	DSMZ, isolado clínico	IS481 detetado, tipagem positiva BH
<i>B. pertussis</i>	ATCC, Tohama I	IS481 detetado, tipagem positiva BP
<i>B. parapertussis</i>	ATCC, 12822	BPP detetado

Todas as amostras testadas foram detetadas como positivas para o patogénico correto pelo Kit Bordetella ELITE MGB®.

Marcadores potencialmente interferentes (reatividade cruzada)

A potencial reatividade cruzada com outros organismos não pretendidos do produto Kit Bordetella ELITE MGB® foi avaliada por análise *in silico* das sequências disponíveis na base de dados de nucleótidos EBI ENA.

A análise não demonstrou homologias significativas para os alvos com a parte principal dos organismos não pretendidos (vírus, bactérias, protozoários e fungos), pelo que não se espera reatividade cruzada. No entanto, foram observadas homologias significativas e potenciais interferências com algumas estirpes de *B. hinzii*, *B. bronchialis* e *B. bronchiseptica* para a deteção de IS481, com algumas estirpes de *B. petrii* para a deteção de *recA* e com *Achromobacter denitrificans* para a deteção de IS1001.

A reatividade cruzada com outros organismos encontrados em amostras respiratórias também foi verificada através de testes a um painel de ADN e ARN genómico certificado do ATCC (EUA).

Foram analisadas amostras de ADN genómico em triplicado para cada marcador potencialmente interferente em associação com o sistema ELITE InGenius no modo "Apenas PCR".

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Marcadores potencialmente interferentes: reatividade cruzada		
Organismos	Estirpe	Resultado
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC, 118	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Candida albicans</i>	ATCC, 3147	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC, Rosenbach	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Escherichia coli</i>	ATCC, H10407	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	ATCC, RB50	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC, Rd	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC, R6	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC, Philadelphia-1	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC, FH	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Chlamydomydia pneumoniae</i>	ATCC, AR-39	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	isolado clínico	Negativo, sem reatividade cruzada
CMV	ATCC, AD-169	Negativo, sem reatividade cruzada
Enterovirus	ATCC, Pesascek	Negativo, sem reatividade cruzada
ADV	ATCC, Adenoid 6	Negativo, sem reatividade cruzada
FluA	ATCC, A/PR/8/34	Negativo, sem reatividade cruzada
FluB	ATCC, B/Florida/4/2006	Negativo, sem reatividade cruzada
RSV	ATCC, A2	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Bordetella petrii</i>	DSMZ, DSM 12804	Negativo, sem reatividade cruzada*
<i>Bordetella petrii</i>	isolado clínico, REF504	Negativo, sem reatividade cruzada**
<i>Bordetella petrii</i>	isolado clínico, REF505	Negativo, sem reatividade cruzada*
<i>Bordetella petrii</i>	isolado clínico, BORD1836	Negativo, sem reatividade cruzada**
<i>Bordetella petrii</i>	isolado clínico, BUR-15-132	Negativo, sem reatividade cruzada**
<i>Bordetella petrii</i>	isolado clínico, BUR-19-174	Negativo, sem reatividade cruzada**

Kit Bordetella ELITe MGB®

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS140ING

A maioria dos organismos potencialmente interferentes testados não apresentaram reatividade cruzada para os alvos usando o Bordetella ELITe MGB® Kit.

De acordo com a análise da sequência, algumas estirpes de *Bordetella petrii* (*) foram positivas para o alvo BH. No entanto, devido à diferença de temperatura de fusão (Tm) entre o recA da *B. holmesii* e o recA de outras espécies de *Bordetella*, o protocolo do ensaio designa "tipagem não exequível".

Além disso, outras estirpes de *B. petrii* (**) têm uma sequência do tipo IS481 e resultam positivas para o alvo IS481. No entanto, devido à diferença de Tm entre o IS481 de *B. pertussis* e *B. holmesii* e o tipo IS481 de outras espécies de *Bordetella*, o protocolo do ensaio designa "outras espécies relacionadas".

Marcadores potencialmente interferentes (inibição)

A ausência de inibição devido a outros organismos não pretendidos encontrados em amostras respiratórias também foi verificada através de testes a um painel de ADN e ARN genômico certificado do ATCC.

As amostras de ADN e ARM genômico a uma elevada concentração (cerca de 100.000 cópias por reação) foram reforçadas pelo ADN genômico de *B. pertussis* ou *B. parapertussis* ou *B. holmesii* (DSMZ) a uma baixa concentração (cerca de 100 cópias por reação) e analisadas em triplicado para cada marcador potencialmente interferente em associação com o sistema ELITe InGenius no modo "Apenas PCR".

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Marcadores potencialmente interferentes: inibição		
Organismos	Estirpe	Resultado
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC, 118	Positivo, sem inibição
<i>Candida albicans</i>	ATCC, 3147	Positivo, sem inibição
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC, Rosenbach	Positivo, sem inibição
<i>Escherichia coli</i>	ATCC, H10407	Positivo, sem inibição
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	ATCC, RB50	Positivo, sem inibição
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC, Rd	Positivo, sem inibição
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC, R6	Positivo, sem inibição
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC, Philadelphia-1	Positivo, sem inibição
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC, FH	Positivo, sem inibição
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	ATCC, AR-39	Positivo, sem inibição
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	isolado clínico	Positivo, sem inibição
CMV	ATCC, AD-169	Positivo, sem inibição
Enterovirus	ATCC, Pesascek	Positivo, sem inibição
ADV	ATCC, Adenoid 6	Positivo, sem inibição
FluA	ATCC, A/PR/8/34	Positivo, sem inibição
FluB	ATCC, B/Florida/4/2006	Positivo, sem inibição
RSV	ATCC, A2	Positivo, sem inibição
<i>Bordetella petrii</i>	DSMZ, DSM 12804	Positivo, sem inibição
<i>Bordetella petrii</i>	isolado clínico, REF504	Positivo, sem inibição
<i>Bordetella petrii</i>	isolado clínico, REF505	Positivo, sem inibição
<i>Bordetella petrii</i>	isolado clínico, BORD1836	Positivo, sem inibição
<i>Bordetella petrii</i>	isolado clínico, BUR-15-132	Positivo, sem inibição
<i>Bordetella petrii</i>	isolado clínico, BUR-19-174	Positivo, sem inibição

Todos os patogênicos de interesse foram corretamente detetados na presença dos organismos potencialmente interferentes listados acima quando testados pelo Kit Bordetella ELITe MGB®.

Potencial interferência entre alvos

A potencial interferência entre alvos do produto Kit Bordetella ELITe MGB® foi avaliada por um teste de coamplificação de materiais de referência de *B. pertussis*, *B. parapertussis* (ATCC) e *B. holmesii* (DSMZ).

O painel incluiu amostras com ADNs genômicos para *B. pertussis* ou *B. parapertussis* ou *B. holmesii* a uma elevada concentração (10⁵ cópias/reação) e os outros patogênicos de interesse a baixos níveis de concentração (por ex., 10³, 10², 10 cópias/reação).

Cada condição foi analisada em triplicado em associação com o sistema ELITe InGenius no modo "Apenas PCR".

Kit Bordetella ELITe MGB®

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS140ING

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Alvo em teste	Potencial interferência entre alvos		
	Alvo interferente (~10 ⁵ cópias/reação)		
	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. holmesii</i>
<i>B. pertussis</i> (IS481)	-	10 c./reação	-
<i>B. parapertussis</i> (IS1001)	10 c./reação	-	100 c./reação
<i>B. holmesii</i> (IS481)	-	10 c./reação	-

B. pertussis, *B. parapertussis* e *B. holmesii* foram detetados pelo Kit Bordetella ELITe MGB® a uma concentração de pelo menos 10 cópias/reação mesmo na presença de outros patogênicos de interesse a uma elevada concentração. No caso de 10⁵ cópias/reação de *B. holmesii*, *B. parapertussis* foi detetado a uma concentração de pelo menos 100 cópias/reação.

O. B. pertussis foi tipado pelo Kit Bordetella ELITe MGB® a uma concentração de pelo menos 10 cópias/reação na presença de *B. parapertussis* a uma elevada concentração e a uma concentração de pelo menos 2 000 cópias/reação na presença de *B. holmesii* a uma elevada concentração.

O. B. holmesii foi tipado pelo Kit Bordetella ELITe MGB® a uma concentração de pelo menos 10 cópias/reação na presença de *B. parapertussis* a uma elevada concentração e a uma concentração de pelo menos 1 000 cópias/reação na presença de *B. pertussis* a uma elevada concentração.

Substâncias interferentes

Um painel de substâncias potencialmente interferentes às respetivas concentrações relevantes mais elevadas foi testado com o produto Kit Bordetella ELITe MGB®. As substâncias testadas foram Mucina, Sangue total humano, o antibiótico Azithromycin, o corticosteroide Beclometasone, o anti-histamínico Ebastine e o mucolítico Hidroclorato de Ambroxol.

As substâncias foram adicionadas individualmente às amostras de Aspirado nasofaríngeo reforçadas pelos materiais de referência de *B. pertussis*, *B. parapertussis* ou *B. holmesii* (DSMZ) a uma concentração de 3x LoD. As amostras foram processadas em 3 réplicas no sistema ELITe InGenius® no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Substância	Concentração	Substâncias interferentes		
		Pos./Rep.		
		<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. holmesii</i>
Mucina	1% w/v (10 mg/mL)	3 / 3	3 / 3	3 / 3
Sangue Total	10% v/v	3 / 3	3 / 3	3 / 3
Azitromicina	0,2 µg/mL	3 / 3	3 / 3	3 / 3
Beclometasone	64 ng/mL	3 / 3	3 / 3	3 / 3
Ebastine	0,4 µg/mL	3 / 3	3 / 3	3 / 3
Ambroxol	0,6 µg/mL	3 / 3	3 / 3	3 / 3

Verificou-se que nenhuma das substâncias testada nas concentrações testadas interferiu com o Kit Bordetella ELITe MGB®.

Repetibilidade

A Capacidade de repetição dos resultados obtidos pelo produto Kit Bordetella ELITe MGB® em associação com o sistema ELITe InGenius foi testada através da realização da análise a um painel de três amostras de Aspirado nasofaríngeo reforçadas pelos materiais de referência de *B. pertussis*, *B. parapertussis* ou *B. holmesii* (DSMZ) a uma concentração de 3x LoD.

Os resultados da Capacidade de repetição foram obtidos através da análise em três réplicas em duas execuções por dia com o mesmo lote do produto, no mesmo instrumento, pelo mesmo operador. Os resultados foram analisados para o mesmo lote do produto (Capacidade de repetição intra-sessão) e para os três diferentes lotes do produto (Capacidade de repetição inter-lote). As amostras foram processadas no sistema ELITe InGenius no modo "Extração + PCR".

Os valores Ct de cada alvo e do alvo do Controlo Interno (CI2) foram usados para calcular a percentagem do Coeficiente de variabilidade (CV) para avaliar a Capacidade de repetição como imprecisão. Na tabela seguinte é apresentado um resumo dos resultados.

Capacidade de repetição intra-sessão				
Alvo	N	Ct médio	Desv. std	%CV
<i>B. pertussis</i> (IS481)	6	36,14	0,34	0,95
<i>B. parapertussis</i> (IS1001)	6	34,70	0,37	1,08
<i>B. holmesii</i> (IS481)	6	36,02	0,27	0,75
Controlo Interno	24	28,77	0,25	0,88

Capacidade de repetição inter-lote				
Alvo	N	Ct médio	Desv. std	%CV
<i>B. pertussis</i> (IS481)	18	36,66	0,95	2,60
<i>B. parapertussis</i> (IS1001)	18	34,89	0,64	1,82
<i>B. holmesii</i> (IS481)	18	36,23	0,75	2,08
Controlo Interno	72	28,58	0,33	1,15

A Capacidade de repetição do produto Kit Bordetella ELITe MGB® para cada alvo revelou uma %CV inferior a 3%.

Reprodutibilidade

A Capacidade de reprodução dos resultados obtidos pelo produto Kit Bordetella ELITe MGB® em associação com o sistema ELITe InGenius foi testada através da realização da análise a um painel de três amostras de Aspirado nasofaríngeo reforçadas pelo material de referência de *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. holmesii* (DSMZ) a uma concentração de 3x LoD.

Os resultados da Capacidade de reprodução foram analisados em três réplicas em duas execuções por dia. Foram testados 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 "Extração + PCR".

Os valores Ct de cada alvo e do alvo do Controlo Interno (CI2) foram usados para calcular a percentagem do Coeficiente de variabilidade (CV) para avaliar a Capacidade de reprodução como imprecisão.

É apresentado a seguir um resumo dos resultados.

Capacidade de reprodução inter-instrumento				
Alvo	N	Ct médio	Desv. std	%CV
<i>B. pertussis</i> (IS481)	18	36,48	0,86	2,35
<i>B. parapertussis</i> (IS1001)	18	34,80	0,68	1,95
<i>B. holmesii</i> (IS481)	18	36,23	0,85	2,34
Controlo Interno	72	28,06	0,48	1,72

A Capacidade de reprodução do produto Kit Bordetella ELITe MGB® para cada alvo revelou uma %CV inferior a 3%.

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 amostras clínicas de Aspirado nasofaríngeo positivas para *B. pertussis* e reforçadas pelo material de referência de *B. parapertussis* ou *B. holmesii* (DSMZ). As amostras positivas e as amostras negativas usadas para o reforço foram certificadas pelo método cultural e um ensaio comercial CE IVD num laboratório externo. As amostras reforçadas de *B. parapertussis* e *B. holmesii* foram reforçadas a uma concentração de 30x, 10x, 3x LoD.

As amostras foram colhidas como descrito em "Amostras e controlos" e testadas com o Kit Bordetella ELITe MGB® e o sistema ELITe InGenius no modo "Extração + PCR".

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	Positivo	Negativo	Invlíd o	% de sensibilidade de diagnóstico
Aspirado nasofaríngeo positivo para <i>B. pertussis</i>	26	24	0	2	100%
Aspirado nasofaríngeo reforçado com <i>B. parapertussis</i>	30	30	0	0	100%
Aspirado nasofaríngeo reforçado com <i>B. holmesii</i>	30	30	0	0	100%

No teste, 24 em 26 amostras de Aspirado nasofaríngeo positivo para *B. pertussis* foram confirmadas positivas. 2 amostras tiveram resultado inválido e foram excluídas da análise.

No teste, todas as amostras de Aspirado nasofaríngeo reforçadas com *B. parapertussis* e *B. holmesii* foram confirmadas positivas.

Neste teste, a Sensibilidade de diagnóstico do ensaio para *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. holmesii* foi igual a 100 % em associação com amostras de Aspirado nasofaríngeo.

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 amostras clínicas de Aspirado nasofaríngeo certificadas negativas para *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. holmesii* pelo método cultural e um ensaio comercial CE IVD num laboratório externo.

As amostras foram colhidas como descrito em "Amostras e controlos" e depois testadas com o Kit Bordetella ELITe MGB® e o sistema ELITe InGenius no modo "Extração + PCR".

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	Positivo	Negativo	Invlíd o	% de especificidade e do diagnóstico
Aspirado nasofaríngeo negativo para <i>B. pertussis</i> / <i>B. holmesii</i>	60	0	59	1	100%
Aspirado nasofaríngeo negativo para <i>B. parapertussis</i>	86	1	82	3	98,8%

No teste, 59 em 60 amostras de Aspirado nasofaríngeo negativo para *B. pertussis* / *B. holmesii* foram confirmadas válidas e negativas. 1 amostra teve resultado inválido e foi excluída da análise.

No teste, 82 em 86 amostras de Aspirado nasofaríngeo negativo para *B. parapertussis* foram confirmadas válidas e negativas. 3 amostras tiveram resultado inválido e foram excluídas da análise. 1 amostra teve um resultado positivo discrepante.

Neste teste, a Especificidade de diagnóstico do ensaio para *B. pertussis* / *B. holmesii* foi igual a 100 % em associação com amostras de Aspirado nasofaríngeo.

Neste teste, a especificidade de diagnóstico do ensaio para *B. parapertussis* foi igual a 98,8 % em associação com amostras de Aspirado nasofaríngeo.

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 "Bordetella ELITe MGB® Kit", FTP 140ING.

REFERÊNCIAS

- U. Reischl et al. (2001) J Clin Microbiol. 39: 1963–1966.
- N. K. Fry et al. (2009) J Med Microbiol. 58: 1023-9.
- A. Van der Zee (1993) J Bacteriol. 175: 141-7.
- J. L. Guthrie et al. (2010) J Clin Microbiol. 48: 1435-7
- E. A. Lukhtanov et al. (2007) Nucleic Acids Res. 35: e30

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

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

Utilize este produto apenas com amostras clínicas de aspirado nasofaríngeo.

Neste momento não existem dados disponíveis relativos ao desempenho do produto com as seguintes amostras clínicas: Esfregaços nasofaríngeos, saliva, lavagem broncoalveolar (LBA), aspirado dos brônquios (AB).

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 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 a utilização de áreas separadas para o teste de biologia molecular e o teste de cultura microbiológica para evitar falsos resultados positivos.

Este produto requer o uso de vestuário especial de laboratório 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 ADN alvo não foi detetado no ADN extraído da amostra. Não pode excluir-se o facto de o ADN alvo ter um título inferior ao limite de deteção do produto (ver Características de desempenho). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

No caso de coinfeções, a sensibilidade de um alvo pode ser afetada pela amplificação de um segundo alvo (ver Características de desempenho).

Em alguns casos, *B. bronchiseptica*, *B. hinzii* e *B. bronchialis* podem albergar as sequências repetidas de IS481, pelo que podem gerar resultados positivos para este alvo.

Em alguns casos, *B. bronchiseptica* e *Achromobacter denitrificans* podem albergar as sequências repetidas de IS1001, pelo que podem gerar resultados positivos para o alvo BPP.

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, o que pode originar um atraso na obtenção dos resultados finais.

Possíveis polimorfismos na região do ADN alvo abrangidos pelos primários do produto e as sondas podem prejudicar a deteção do ADN 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 de Positive Control inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da PCR Mix e do Positive Control. Verifique os volumes da PCR Mix e do Positive Control.
Degradação do Positive Control.	Utilize uma nova alíquota de Positive Control.
Degradação da PCR Mix.(Mistura de PCR)	Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
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 PCR e do controlo negativo. Verifique os volumes da Mistura PCR e do controlo negativo.
Contaminação do controlo negativo	Utilize uma nova alíquota de água de grau de biologia molecular.
Contaminação da PCR Mix (Mistura de PCR)	Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Contaminação da área de extração, de Racks ou do Inventory Block.	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 preparação da sessão.	Verifique a posição da PCR Mix e da amostra. Verifique os volumes da PCR Mix e da amostra.
Degradação do Controlo Interno.	Utilize novas alíquotas de Controlo Interno.
Degradação da PCR Mix.(Mistura de PCR)	Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Inibição devido a substâncias que interferem na amostra.	Repita a amplificação com uma diluição de 1:2 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR only" (Apenas PCR). Repita a extração com uma diluição 1:2 em água de qualidade para biologia molecular da amostra principal numa sessão "Extract + PCR" (Extração + PCR).
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Elevada taxa anômala de resultados positivos na mesma sessão (reações com valores Ct recentes semelhantes) Causas possíveis Soluções

Causas possíveis	Soluções
Contaminação amostra-para-amostra durante as etapas pré-analíticas	Evitar qualquer contacto entre a micropipeta e a parede do tubo. Limpar a micropipeta com uma solução de hipoclorito de sódio a 3% nova ou ADN/ARN mais limpo após usar a pipeta em cada amostra. Não usar pipetas Pasteur. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. Introduzir as amostras nas últimas posições dos instrumentos, tal como indicado nas GUI do ELITE InGenius. Siga a sequência de carregamento indicada pelo software
Contaminação pelo ambiente laboratorial	Limpe todas as superfícies em contacto com o operador e as amostras (incluindo as pipetas) com uma solução de hipoclorito de sódio a 3% nova ou ADN/ARN mais limpo. Realize um ciclo de descontaminação U.V. Utilize um novo tubo da PCR mix.

Erro 30103

Causas possíveis	Soluções
Concentração demasiado alta do alvo na amostra.	Se for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR: - seleccione 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" (apenas PCR) ou - repita a extração com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular da amostra principal numa sessão "Extract + PCR" (Extração + PCR).

Erro TH

Causas possíveis	Soluções
Amostra com formato anômalo do traçado.	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" (apenas PCR) ou - repita a extração com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular da amostra principal numa sessão "Extract + PCR" (Extração + PCR).

SÍMBOLOS

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

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

REF RTS140ING

**NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA
LIMITADA**

Este produto contém reagentes produzidos pela Life Technologies Corporation e são vendidos ao abrigo de contratos de licenciamento celebrados entre a ELITechGroup S.p.A. e respetivas sucursais e a Life Technologies Corporation. O preço de compra deste produto inclui direitos exclusivos, não transmissíveis, de utilização apenas desta quantidade do produto exclusivamente para atividades do comprador que estejam diretamente relacionadas com diagnósticos em humanos. Para obter mais informações sobre a aquisição de uma licença deste produto para outros fins que não os acima indicados, contacte o Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Telefone: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. E-mail: outlicensing@thermofisher.com.

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

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