

NOTICE of CHANGE dated 20/08/2024

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«Coagulation ELITe MGB[®] Kit»

Ref. RTSD00ING

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

- *Update for compliance with the Regulation (EU) 2017/746 on in vitro diagnostic medical devices (IVDR) requirements and update of the Intended use, accordingly.*
- **NOTE:** *Composition and PERFORMANCE CHARACTERISTICS of the product remain unchanged.*
- **NOTE:** *The product lots reported into the table below are still placed on the market as per IVDD (98/79/EC) until expiration dates, according to Article 110 of IVDR. If you're using these product lots, the related IFU revision, NOT available anymore on the website, can be requested by contacting ELITechGroup staff.*

PRODUCT REF	Lot Number	Expiry date
RTSD00ING	U1123-091	31/08/2025
RTSD00ING	U0524-050	31/07/2025

PLEASE NOTE

	LA REVISIONE DI QUESTA IFU NON È COMPATIBILE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT
	THE REVISION OF THIS IFU IS NOT COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT
	LA RÉVISION DE CETTE IFU N'EST PAS COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRÉCÉDENTE DU KIT
	LA REVISIÓN DE ESTE IFU NO ES COMPATIBLE CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT
	A REVISÃO DO ESTE IFU NÃO ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT
	DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST NICHT KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS



Coagulation ELITE MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTSD00ING

UDI 08033891486204



ÍNDICE

UTILIZAÇÃO PREVISTA	página 1
PRINCÍPIOS DO ENSAIO	página 2
DESCRIÇÃO DO PRODUTO	página 2
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
ELITE InGenius	página 5
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 5
PROCEDIMENTO	página 6
ELITE BeGenius	página 12
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 12
PROCEDIMENTO	página 13
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DO ELITE InGenius e ELITE BeGenius	página 17
REFERÊNCIAS	página 25
LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	página 25
RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	página 26
SÍMBOLOS	página 27
NOTIFICAÇÃO PARA OS UTILIZADORES	página 28
NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	página 28
ANEXO	página A

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto **Coagulation ELITE MGB® Kit** é um dispositivo médico de diagnóstico in vitro que se destina a ser usado por profissionais de saúde como um ensaio de PCR em tempo real dos ácidos nucleicos qualitativos para a discriminação alélica dos seguintes três locos em amostras de ADN genómico humano colhidas dos seguintes espécimes:

- gene do fator V de coagulação, polimorfismo do nucleótido único (SNP) G1691A (Leiden),
- gene do fator II da coagulação, SNP G20210A,
- gene da 5,10-metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), SNP C677T.

O ensaio é validado em associação com os instrumentos **ELITE InGenius®** e **ELITE BeGenius®**, automatizados e integrados para extração, PCR em tempo real e interpretação de resultados, utilizando amostras humanas de sangue total colhido em EDTA.

O produto está previsto para utilização como auxiliar na avaliação do risco de trombose venosa profunda, em pacientes com suspeita de alterações na coagulação e em risco de trombose venosa profunda.

Coagulation ELITE MGB® Kit

reagente para amplificação do ADN em tempo real

REF RTSD00ING

Os resultados devem ser interpretados em conjunto com todas as observações clínicas e resultados laboratoriais relevantes.

PRINCÍPIOS DO ENSAIO

O ensaio consiste na PCR em tempo real qualitativa validada no **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**, sistemas automáticos e integrados para extração, amplificação e deteção de ácidos nucleicos e interpretação de resultados.

Com base no ADN genómico colhido das amostras em teste, são realizadas no cartucho três reações de amplificação específicas para a codificação de três genes humanos para os alvos de interesse e uma reação de amplificação específica para o controlo interno (verificação da adequação da amostra) é realizada na PCR Cassette:

- Fator V, região SNP G1691A (Leiden), detetado por uma sonda específica identificada com fluoróforo AP639 no canal "FV" do instrumento,
- Fator II, região SNP G20210A, detetado por uma sonda específica identificada com fluoróforo FAM no canal "FI" do instrumento,
- MTHFR, região SNP C677T, detetado por uma sonda específica identificada com fluoróforo AP593 AP639 no canal "MTHFR" do instrumento.
- Controlo interno, região do gene da beta globina humano, detetado por uma sonda identificada com fluoróforo AP525 AP639 no canal "IC" do instrumento.

As sondas com a tecnologia ELITE MGB® são ativadas quando hibridizam com o produto específico da reação de amplificação. O **ELITE InGenius** e o **ELITE BeGenius** monitorizam o aumento da fluorescência e calculam os ciclos de limiar (Ct).

No fim do ciclo de amplificação, a análise da curva de fusão permite identificar as temperatura de fusão das sondas e detetar a presença do tipo selvagem e/ou de alelos mutados.

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O **Coagulation ELITE MGB Kit**, os consumíveis do produto **52M PCR Mix**, uma mistura completa para a amplificação em tempo real, **oito tubos de ensaio prontos a usar e aliquotados**. Cada tubo contém **280 µL** de solução e é suficiente para **12 testes no ELITE InGenius e ELITE BeGenius** se processar, pelo menos, 2 amostras por sessão.

A **52M PCR Mix** contém os primários e sonda específicos para:

- gene Fator V da coagulação, região SNP G1691A (Leiden). A sonda é etiquetada com fluoróforo AP639, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma molécula não fluorescente,
- gene do Fator II da coagulação, região SNP G20210A. A sonda é etiquetada com fluoróforo FAM, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma molécula não fluorescente,
- para o gene MTHFR, região SNP C677T. A sonda é etiquetada com fluoróforo AP593, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma molécula não fluorescente,
- o CI, região do gene humano codificador da betaglobulina. A sonda é etiquetada com fluoróforo AP525, estabilizada pelo grupo MGB® e inativada por uma disposição de extinção não fluorescente,

A **52M PCR Mix** também contém tampão, cloreto de magnésio, trifosfatos de nucleótido e hot-start DNA Polimerase.

O produto é suficiente para **96 testes** em associação com o **ELITE InGenius** e o **ELITE BeGenius**, sendo usados 20 µL por reação.

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

REF RTSD00ING

MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
52M PCR Mix	Mistura de reação completa	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.
- Microcentrifuga de bancada (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas e pontas estéreis com filtro de aerossol ou pontas de deslocação positiva estéreis (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Água de grau de biologia molecular.

OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

Os reagentes para extração do ADN das amostras a serem analisadas, o positive control da amplificação e os consumíveis **não** estão incluídos neste produto.

Para análise de amostras automática com o **ELITE InGenius** (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, ref. INT030) ou **ELITE BeGenius** (EG SpA, ref. INT040) são necessários os seguintes produtos genéricos:

- cartuchos de extração **ELITE InGenius® SP 200** (EG SpA, Ref. INT032SP200),
- consumíveis de extração **ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set** (EG SpA, Ref. INT032CS),
- **ELITE InGenius® Waste Box** (EG SpA, ref. F2102-000),
- **ELITE InGenius® PCR Cassette** (EG SpA, Ref. INT035PCR),
- **300 µL Filter Tips Axygen** (Corning Life Science, ref. TF-350-L-R-S), para o **ELITE InGenius**,
- **1000 µL Filter Tips Tecan** (Tecan, ref. 30180118), para o **ELITE BeGenius**.

Para a extração automática de ácidos nucleicos, a PCR em tempo real e a interpretação dos resultados das amostras com o **ELITE BeGenius** e são necessários os seguintes protocolos de ensaio específicos:

- parâmetros para o positive control da amplificação **52M ELITE_PC**,
- parâmetros para o negative control da amplificação **52M ELITE_NC**,
- parâmetros para amostras de plasma a serem analisadas **52M ELITE_WB_200_200**.

Para a extração automática de ácidos nucleicos, a PCR em tempo real e a interpretação dos resultados das amostras com o **ELITE BeGenius** e são necessários os seguintes protocolos de ensaio específicos:

- parâmetros para o positive control da amplificação **52M ELITE_Be_PC**,
- parâmetros para o negative control da amplificação **52M ELITE_Be_NC**,
- parâmetros para amostras de plasma a serem analisadas **52M ELITE_Be_WB_200_200**.

Como modelo do positive control da amplificação, é necessário o produto específico **Coagulation - ELITE Positive Control** (EG SpA, ref. CTRD00ING). Esta é uma solução estabilizada contendo ADNs plasmídeos.

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

REF RTSD00ING

AVISOS E PRECAUÇÕES

Este produto foi concebido exclusivamente para utilização exclusiva *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 (lixívia) ou em autoclave durante uma hora a 121° C antes da eliminação. Não permita que os reagentes de extração entrem em contacto com hipoclorito de sódio (lixívia).

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

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

Nunca deve pipetar soluções com a boca.

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

Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.

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

Leia atentamente todas as instruções fornecidas 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 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 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.

Os reagentes devem ser manuseados sob uma câmara de fluxo laminar. As pipetas usadas no manuseamento dos reagentes devem ser usadas exclusivamente para este fim. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

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

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 **52M PCR Mix** deve ser guardada a -20 °C ou menos e ao abrigo da luz.

A **52M PCR Mix** deve ser utilizada no prazo de um mês após a primeira abertura.

A **52M PCR Mix** pode ser congelada e descongelada para um máximo de **sete sessões**: quaisquer ciclos de congelação/descongelação adicionais podem causar um menor desempenho do produto.

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

REF RTSD00ING

O **52M PCR Mix** pode ser mantida no bloco de frio da área do inventário do **ELITE InGenius** ou na unidade de frio do **ELITE BeGenius** para **até sete sessões separadas de três horas cada** (modo Extract + PCR) (Extração + PCR), ou durante 2 sessões de 3 horas cada e (modo Extract + PCR) (Extração + PCR) e durante o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão de trabalho (7 horas no total). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

ELITE InGenius
AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser utilizado com amostras de sangue total colhido em EDTA.

As amostras de sangue total para extração de ADN têm de ser colhidas em EDTA e identificadas de acordo com as orientações do laboratório, transportadas a +2 / +8° C e armazenadas a +2 / +8° C durante um máximo de três dias, caso contrário têm de ser congeladas e armazenadas a -20 ou -70 °C ou inferior durante um máximo de trinta dias. Mesmo sendo possíveis períodos de armazenamento mais longos a -70 °C ou inferior, conforme o extensivamente indicado pela literatura científica, a sua aplicação deve ser avaliada internamente pelo utilizador final deste produto.

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

Nota: quando a extração de amostras de ADN de sangue total for realizada com o **ELITE InGenius** e com o Software **ELITE InGenius** versão **1.2** (ou versões equivalentes mais recentes), use o protocolo de ensaio **52M ELITE_WB_200_200**. Este protocolo processa 200 µL de amostra e elui os ácidos nucleicos em 200 µL. Quando é usado um tubo primário (13 x 7,5 mm), o volume de amostra tem de ser de pelo menos 2,2 mL.

Outras amostras

Não existem dados disponíveis relativos aos desempenhos do produto com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: saliva.

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 controlo de amplificação Positivo, utilize o produto **Coagulation - ELITE Positive Control** (não fornecido com este kit) em associação com o protocolo **52M ELITE_PC**
- como controlo de amplificação negativo, utilize água de qualidade molecular (não fornecida com este kit) em associação com o protocolo **52M ELITE_NC**,

Nota: O **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.

Para além disso, 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 realizado qualquer serviço de manutenção significativo no instrumento ELITE InGenius.

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

REF RTSD00ING

Controlos da qualidade

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

PROCEDIMENTO

O uso do **Coagulation ELITE MGB Kit** com o **ELITE InGenius** consiste em três passos:

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

Verificação da prontidão do sistema

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

- ligar o ELITE InGenius e selecionar o modo de início de sessão "**CLOSED**" (Fechado),
- verificar que os controlos da amplificação (52M Positive Control, 52M 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 controlos da amplificação aprovados ou válidos, execute-os como descrito nos parágrafos seguintes,
- escolher o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela EG SpA. 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 **Coagulation ELITE MGB Kit** está descrito na tabela seguinte.

Protocolo de ensaio para o Coagulation ELITE MGB Kit			
Nome	Matriz	Relatório	Características
52M ELITE_WB_200_200	Sangue Total	Tipo selvagem/heterozigótico/homozigótico	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 200 µL Internal Control: NÃO 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 Apoio ao cliente ELITechGroup da sua localidade.

Preparação da sessão

O **Coagulation ELITE MGB Kit** pode ser usado no **ELITE InGenius** para realizar:

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

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

Nota: O sistema **ELITE InGenius** pode ser ligado ao "Servidor de informações de localização" (LIS), que permite carregar a informação da sessão. Consulte o manual de utilizador do instrumento **ELITE InGenius** 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, execute os passos seguintes de acordo com a Interface gráfica do utilizador (GUI) do SW:

1. Aqueça as amostras à temperatura ambiente (+21 ±5 °C) e processe-as de acordo com as diretrizes laboratoriais e a secção "Amostras e controlos".
2. Descongele os tubos **52M PCR Mix** à temperatura ambiente (+21 ±5 °C) durante 30 minutos para a sessão. Cada tubo é suficiente para 12 reações em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Proteja a **52M PCR Mix** da luz enquanto a aquece, dado que este reagente é fotossensível.

3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
4. Certifique-se de que o "Volume de entrada de extração" é de 200 µL e que o Volume de eluição extraído é de 200 µL.
5. Para cada Rastreo de interesse preencha a "SampleID" (SID) digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
6. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (isto é, 52M ELITe_WB_200_200).
7. Certifique-se de que o "Protocol" apresentado é: "Extract + PCR"(Extraction + PCR).
8. Selecione a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position":
 - se for usado um tubo primário, selecione "Tubo primário",
 - se for usado um tubo secundário, selecione "Tubo de extração".Selecione "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue a **52M PCR Mix** no "Inventory Block" selecionado pela seguinte instrução da GUI e preencha o número do lote e a data de validade do **52M PCR Mix**. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
10. 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.
11. Carregue as "**PCR Cassettes**", os cartuchos de extração "**ELITe InGenius SP 200**", todos os consumíveis necessários e as amostras a serem extraídas, seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
12. Feche a porta do instrumento.
13. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

Nota: A PCR Mix pode ser usada durante 7 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser armazenada no bloco refrigerado durante 2 sessões de 3 horas cada (modo Extract + PCR) (Extração + PCR) e durante o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão de trabalho (7 horas no total). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

B Execução de amplificação

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

1. Descongele os tubos **52M PCR Mix** à temperatura ambiente (+21 ±5 °C) durante 30 minutos 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: Proteja a **52M PCR Mix** da luz enquanto a aquece, dado que este reagente é fotossensível.

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 200 µL.
4. Para cada Rastreo 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" (isto é, 52M ELITe_WB_200_200).
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 **52M PCR Mix** no "Inventory Block" selecionado pela seguinte instrução da GUI e preencha o número do lote e a data de validade do **52M PCR Mix**. 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 Cassette**" 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.

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

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

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

Nota: A PCR Mix pode ser usada durante 7 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser armazenada no bloco refrigerado durante 2 sessões de 3 horas cada (modo Extract + PCR) (Extração + PCR) e durante o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão de trabalho (7 horas no total). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

C. Execução de amplificação para o Positive Control e Negative Control

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

1. Descongele os tubos **52M PCR Mix** à temperatura ambiente (+21 ±5 °C) durante 30 minutos 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 o **52M PCR Mix** num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

2. Descongele o tubo **52M Positive Control** para a sessão. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Transfira pelo menos 50 µL de água de qualidade para biologia molecular para um "Tubo de eluição", fornecido com o Conjunto de consumíveis "ELITe InGenius® SP 200".
4. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
5. No Rastreo de interesse, selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay".
6. Para o positive control, selecione o Protocolo de ensaio 52M ELITe_PC na coluna "Assay" e preencha o número do lote e a data de validade do 52M Positive Control.
7. Para o negative control, selecione o Protocolo do ensaio 52M ELITe_NC na coluna "Assay" e preencha o número do lote e a data de validade da água de qualidade para biologia molecular.
8. Selecione "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue a **52M PCR Mix** no "Inventory Block" selecionado pela seguinte instrução da GUI e preencha o número do lote e a data de validade do **52M PCR Mix**. Selecione "Next" para continuar a preparação.
10. 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.
11. Carregue as "**PCR Cassettes**", o tubo "**52M Positive Control**" e o tubo de negative control seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
12. Feche a porta do instrumento.
13. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

Nota: A PCR Mix pode ser usada durante 7 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser armazenada no bloco refrigerado durante 2 sessões de 3 horas cada (modo Extract + PCR) (Extração + PCR) e durante o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão de trabalho (7 horas no total). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

Revisão e aprovação de resultados

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

Nota: O **ELITe InGenius** pode ser ligado ao "Servidor de Informações de Localização" (LIS), que permite enviar os resultados da sessão para o datacenter do laboratório. Consulte o manual de utilizador do instrumento **ELITe InGenius** para obter mais informações.

O **ELITe InGenius** gera os resultados com o produto **Coagulation ELITe MGB Kit** através do seguinte procedimento:

- A. Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação,
- B. Validação dos resultados da amostra,
- C. 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 três genes (canais **FV**, **FII**, **MTHFR**) e para o IC (canal **IC**) reação de amplificação de Positive Control e Negative Control são analisados automaticamente e interpretados pelo software do **ELITe InGenius** com os parâmetros incluídos nos Protocolos de ensaio "52M ELITe_PC" e "52M ELITe_NC".

Os resultados do Positive Control e Negative Control, 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 expiram **após 15 dias**.

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

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

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

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

B. Validação dos resultados da amostra

Os sinais de fluorescência emitidos pelas sondas dos três genes (Canais **FV**, **FII**, **MTHFR**) e pela sonda do IC (Canal **IC**) nas reações de amplificação da amostra são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos no Protocolo de ensaio.

O **ELITE InGenius software** interpreta os resultados da PCR para os três genes (Canais **MTHFR**, **FV**, **FII**) e a sonda de Controlo Interno (Canal **IC**) com os parâmetros do protocolo do ensaio **52M ELITE_WB_200_200**.

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

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

1) Positive Control	Estado
52M Positive Control	APROVADO
2) Negative Control	Estado
52M Negative Control	APROVADO

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

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

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

Resultado da execução da amostra	Interpretação
FV: Tipo selvagem para o Fator V	A amostra possui um genótipo de tipo selvagem para o Fator V SNP loco G1691A.
FV: Heterozigótico para o Fator V Leiden	A amostra possui um genótipo heterozigótico mutado (Leiden) para o Fator V SNP loco G1691A.
FV: Homozigótico para o Fator V Leiden	A amostra possui um genótipo homozigótico mutado (Leiden) para o Fator V SNP loco G1691A.
FII: Tipo selvagem para o Fator II	A amostra possui um genótipo de tipo selvagem para o Fator II SNP loco G20210A.
FII: Heterozigótico para o fator II 20210A	A amostra possui um genótipo heterozigótico mutado (20210A) para o Fator V SNP loco G20210A.
FII: Homozigótico para o fator II 20210A	A amostra possui um genótipo homozigótico mutado (20210A) para o Fator V SNP loco G20210A.
MTHFR: Tipo selvagem para MTHFR	A amostra possui um genótipo de tipo selvagem para o MTHFR SNP loco C677T.
MTHFR: Heterozigótico para o MTHFR 677T	A amostra possui um genótipo heterozigótico mutado (677T) para o MTHFR SNP loco C677T.
MTHFR: Homozigótico para o fator MTHFR 677T	A amostra possui um genótipo homozigótico mutado (677T) para o MTHFR SNP loco C677T.
CI: Amostra válida	A amostra possui um valor Ct do IC menor que 26,5 e é válida
Inconclusivo - Voltar a testar a amostra	Resultado do ensaio inconclusivo devido a um problema na amostra.
Inválido - Voltar a testar a amostra	Resultado da amostra inválido devido a um problema de extração incorreta ou transferência do inibidor.

Amostras reportadas como "Inconclusivo - Voltar a testar a amostra" não são adequadas para a interpretação dos resultados, devido a não ter sido possível detetar a temperatura de fusão (Tm) dos alelos selvagem e mutados. "Neste caso, a análise da curva de dissociação não foi realizada com êxito devido a problemas na amostra (transferência de inibidores na eluição ou presença de outro SNP interferentes), que pode causar resultados incorretos.

As amostras não adequadas para interpretação dos resultados são reportadas como "Inválido - Voltar a testar a amostra" pelo **ELITE InGenius Software**. Neste caso, o ADN genômico humano da amostra 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 ou ADN na amostra insuficiente), 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".

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.

Nota: ao aprovar os resultados do ensaio, certifique-se sempre de verificar o resultado do instrumento, observando os gráficos da curva de fusão no relatório da sessão de trabalho. As temperaturas de fusão (Tm) do tipo selvagem e/ou alelos mutados de cada gene na análise têm de corresponder aos picos mostrados nos gráficos da curva de fusão.

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. Elaboração do relatório 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.

ELITE BeGenius

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser utilizado com amostras de sangue total colhido em EDTA.

As amostras de sangue total para extração de ADN têm de ser colhidas em EDTA e identificadas de acordo com as orientações do laboratório, transportadas a +2 / +8° C e armazenadas a +2 / +8° C durante um máximo de três dias, caso contrário têm de ser congeladas e armazenadas a -20 ou -70 °C ou inferior durante um máximo de trinta dias. Mesmo sendo possíveis períodos de armazenamento mais longos a -70 °C ou inferior, conforme o extensivamente indicado pela literatura científica, a sua aplicação deve ser avaliada internamente pelo utilizador final deste produto.

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

Nota: quando a extração de amostras de ADN de sangue total for realizada com o **ELITE BeGenius** e com o **Software ELITE BeGenius** versão 2.1.0 (ou versões equivalentes mais recentes), use o protocolo de ensaio **52M ELITE_Be_WB_200_200**. Este protocolo processa 200 µL de amostra e elui os ácidos nucleicos em 200 µL. Quando é usado um tubo primário (13 x 75 mm, 13 x 100 mm ou 16 x 100 mm), o volume de amostra tem de ser de pelo menos 1,5 mL.

Outras amostras

Não existem dados disponíveis relativos aos desempenhos do produto com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: saliva.

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 controlo de amplificação Positivo, utilize o produto **Coagulation - ELITE Positive Control** (não fornecido com este kit) em associação com o protocolo **52M ELITE_Be_PC**,
- como controlo de amplificação negativo, utilize água de qualidade molecular (não fornecida com este kit) em associação com o protocolo **52M ELITE_Be_NC**.

Nota: O instrumento ELITE BeGenius 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.

Para além disso, 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 realizado qualquer serviço de manutenção significativo no instrumento ELITE BeGenius.

Controlos da qualidade

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

PROCEDIMENTO

O uso do **Coagulation ELITE MGB Kit** com o **ELITE BeGenius** consiste em três passos:

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

Verificação da prontidão do sistema

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

- ligar o **ELITE BeGenius** e selecionar o modo de início de sessão “**CLOSED**” (Fechado),
- verificar se os controlos da amplificação (52M Positive Control, 52M Negative Control) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de **52 M PCR Mix** a ser utilizado. Caso não haja controlos de amplificação válidos disponíveis para o lote da **52 M PCR Mix**, execute os controlos da amplificação conforme descrito de seguida.
- escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela ELITechGroup S.p.A. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os kits ELITE MGB, o instrumento **ELITE BeGenius** e a matriz citada.

- O protocolo do ensaio disponível para teste da amostra com o produto **Coagulation ELITE MGB Kit** está descrito na tabela seguinte:

Protocolo de ensaio para o Coagulation ELITE MGB Kit			
Nome	Matriz	Relatório	Características
52M ELITE_Be_WB_200_200	Sangue Total	Tipo selvagem/heterozigótico/homozigótico	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 200 µL Internal Control: NÃO Sonicção: 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 Apoio ao cliente da ELITechGroup de sua localidade.

Configuração da sessão

O **Coagulation ELITE MGB Kit** em associação com o **ELITE BeGenius** pode ser usado para:

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

Nota: O instrumento ELITE BeGenius 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 **ELITE BeGenius** 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:

- Aqueça as amostras à temperatura ambiente (+21 ±5 °C) e processe-as de acordo com as diretrizes laboratoriais e a secção “Amostras e controlos”.
- Descongele os tubos da **52M PCR Mix** necessários à temperatura ambiente (+21 ±5 °C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 12 reações em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Proteja a **52M PCR Mix** da luz enquanto a aquece, dado que este reagente é fotossensível.

- Selecione “Perform Run” a partir do ecrã “Home screen”.
- Retire os suportes da “Cooler Unit” e coloque-os na mesa de preparação.
- Selecione o “run mode”: “Extract + PCR”(Extraction + PCR).
- Carregue as amostras nos suportes 5 e 4 (começando sempre pelo suporte 5), usando adaptadores para um encaixe adequado, se necessário.
- Insira o suporte na “Cooler Unit”. Selecione “Next” para continuar.

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

- Certifique-se de que o Volume de entrada de extração é de 200 µL e que o “Volume de eluição da extração” é de 200 µL.

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

REF RTSD00ING

9. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (isto é, 52M ELITE_Be_WB_200_200). Selecione "Next" para continuar.
10. Se for usado o suporte 4, repita os passos 7 a 9.
11. Carregue os tubos de eluato nos Racks 3 e 2 (comece sempre com o Rack 3).

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

12. Insira o suporte na "Cooler Unit". Selecione "Next" para continuar.
13. Se for usado o rack 2, repita o passo 12.
14. Carregue a **52M-PCR Mix** no Rack 1.
15. Insira o Rack 1 na "Cooler Unit". Selecione "Next" para continuar.
16. Verifique as pontas nos Tip Racks na "Inventory Area" e substitua o Rack(s) de pontas, se necessário. Selecione "Next" para continuar.
17. Carregue o Cesto com **PCR Cassette** na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar.
18. Carregue o Cesto com os cartuchos de extração **ELITE InGenius SP 200** e os consumíveis de extração necessários seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar.
19. Feche a porta do instrumento.
20. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

Nota: No final da execução a restante amostra extraída no "Elution Tube" (Tubo de eluição) deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 °C ou menos.

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

Nota: A PCR Mix pode ser usada durante 7 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser armazenada no bloco refrigerado durante 2 sessões de 3 horas cada (modo Extract + PCR) (Extração + PCR) e durante o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão de trabalho (7 horas no total). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

B Execução de amplificação

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

1. Se necessário, descongele as amostras diluídas à temperatura ambiente (+21 ± 5 °C). Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
1. Descongele os tubos da **52M PCR Mix** necessários à temperatura ambiente (+21 ± 5 °C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 24 reações em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Proteja a **52M PCR Mix** da luz enquanto a aquece, dado que este reagente é fotossensível.

2. Selecione "Perform Run" no ecrã "Home screen".
3. Retire os Suportes 1, 2 e 3 da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
4. Selecione o modo de execução: "PCR Only".
5. Carregue as amostras nos Racks 3 e 2 (comece sempre com o Rack 3).
6. Insira o suporte na "Cooler Unit". Selecione "Next" para continuar.
7. Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" é de 200 µL e que o "Extraction Elute Volume" é de 200 µL, mesmo se a extração não estiver a ser realizada.

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

REF RTSD00ING

8. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (por ex., 52M ELITE_Be_WB_200_200). Selecione "Next" para continuar.
9. Se for usado o suporte 2, repita os passos 7 a 9.
10. Carregue a **52M PCR Mix** no suporte 1.
11. Insira o suporte na "Cooler Unit". Selecione "Next" para continuar.
12. Verifique as pontas nos Tip Racks na "Inventory Area" e substitua o Rack(s) de pontas, se necessário. Selecione "Next" para continuar.
13. Carregue o cesto com **PCR Cassette** na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar.
14. Feche a porta do instrumento.
15. Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

Nota: No final da execução a restante amostra extraída deve ser removida do instrumento, tapada e guardada a ~-20 °C ou menos. Evite derramar a Amostra extraída.

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

Nota: A PCR Mix pode ser usada durante 7 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser armazenada no bloco refrigerado durante 2 sessões de 3 horas cada (modo Extract + PCR) (Extração + PCR) e durante o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão de trabalho (7 horas no total). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

C. Execução de amplificação para o Positive Control e Negative Control

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

1. Descongele os tubos da **52M PCR Mix** necessários à temperatura ambiente (+21 ± 5 °C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 12 reações em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Proteja a **52M PCR Mix** da luz enquanto a aquece, dado que este reagente é fotossensível.

2. Descongele os tubos de **52M Positive Control** à temperatura ambiente (+21 ± 5 °C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 4 reações. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Transfira ≥50 µL de água de qualidade para biologia molecular (como negative control) num tubo de eluição, fornecido com o **ELITE InGenius SP Consumable Set**.
4. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
5. Retire os Suportes 1, 2 e 3 da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
6. Selecione o modo de execução: "PCR Only".
7. Carregue os tubos de positive control e negative control nos suportes 3.
8. Insira o suporte na "Cooler Unit". Selecione "Next" para continuar.
9. Selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (por ex., (52M ELITE_Be_PC e 52M ELITE_Be_NC). Clique no botão "Next" para continuar.
10. Carregue a **52M PCR Mix** no rack 2.
11. Insira o Rack 2 na "Cooler Unit". Selecione "Next" para continuar a preparação.
12. Verifique as pontas nos Tip Racks na "Inventory Area" e substitua o Rack(s) de pontas, se necessário. Selecione "Next" para continuar.

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

REF RTSD00ING

- Carregue o Cesto com **PCR Cassette** na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione "Start" para iniciar a execução.

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

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

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

Nota: A PCR Mix pode ser usada durante 7 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada ou pode ser armazenada no bloco refrigerado durante 2 sessões de 3 horas cada (modo Extract + PCR) (Extração + PCR) e durante o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão de trabalho (7 horas no total). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

Revisão e aprovação de resultados

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

O ELITE BeGenius gera os resultados utilizando o **Coagulation ELITE MGB Kit** 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.

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

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DO ELITE InGenius e ELITE BeGenius

Eficiência da deteção (inclusividade)

A eficiência de deteção dos genes do Fator V, Fator II e MTHFR foi avaliada através da comparação de sequências com a base de dados de nucleótidos.

A análise das regiões escolhidas para a hibridização dos primários no alinhamento das sequências disponíveis na base de dados revelou a respetiva conservação e ausência de mutações significativas.

As sondas fluorescentes permitem detetar os alelos dos genes do Fator V, Fator II e MTHFR constantes da seguinte tabela. Os limites de intervalos de Tm relacionados para o **ELITE InGenius** foram calculados com dados obtidos em estudos de verificação e validação e os intervalos de Tm utilizados são mostrados na tabela seguinte. Os intervalos de Tm para o **ELITE BeGenius** foram calculados analisando dados obtidos no estudo de verificação relacionado com a extensão de utilização do produto no **ELITE BeGenius**.

Gene	Alelo detetado	Intervalo Tm	
		ELITE InGenius	ELITE BeGenius
Fator V	Alelo 1691G (tipo selvagem)	53,0 °C – 57,0 °C	52,5 °C – 56,5 °C
	Alelo 1691A (mutado, Leiden)	61,0 °C – 65,0 °C	59,5 °C – 63,5 °C
Fator II	Alelo 20210G (tipo selvagem)	56,0 °C – 61,0 °C	55,0 °C – 60,0 °C
	Alelo 20210A (mutado)	64,0 °C – 69,0 °C	63,0 °C – 68,0 °C
MTHFR	Alelo MTHFR 677C (tipo selvagem)	55,0 °C – 59,0 °C	54,0 °C – 58,0 °C
	Alelo MTHFR 677T (mutado)	64,0 °C – 68,0 °C	63,0 °C – 67,0 °C

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

REF RTSD00ING

Sensibilidade analítica:

A sensibilidade analítica do **Coagulation ELITE MGB Kit** foi definida no **ELITE InGenius** (modo PCR Only) e foi verificada no **ELITE BeGenius** (modo PCR Only).

A sensibilidade analítica deste ensaio permite identificar a presença de cerca de 20.000 moléculas de ADN alvo (correspondente a genomas de ~ 10.000 células ou ~ 70 ng de ADN genómico humano) em 20 µL de ADN extraído na reação.

Foi verificada a sensibilidade analítica usando painéis de ADN genómico humano certificados para o Fator V e Fator II (Referência da OMS para Reagente Fator V Leiden, gADN humano, 1º Pannel Genético Internacional, NIBSC, Reino Unido, código 04/224 e Referência da OMS do Reagente de mutação da protrombina G20210A, gADN humano, 1º Pannel Genético Internacional, NIBSC, Reino Unido, código 05/130).

As três amostras (tipo selvagem, heterozigótico e homozigótico) de cada painel foram testadas em 4 réplicas através de cerca de 70 ng por reação para a realização do procedimento de amplificação e a deteção com o produto e o **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius**. Todas as réplicas foram consideradas válidas e corretamente determinadas.

Especificidade analítica

A Especificidade Analítica deste ensaio, bem como a capacidade de não identificar como Fator II mutado para SNP G20210A o gene mutado para SNP C20209T foram verificadas usando ADN de plasmídeo que contém o amplicon do Fator II com nucleótido de tipo selvagem (G) na posição 20210 e o nucleótido mutante (T) na posição 20209.

Foi usada uma amostra simulada contendo cerca de 80.000 cópias de ADN de plasmídeo em 24 réplicas para executar o procedimento de amplificação e deteção com o produto e o **ELITE InGenius**. Todas as réplicas foram corretamente determinadas: nenhuma amostra mutada para o Fator II SNP C20209T foi designada de heterozigótica ou homozigótica mutada para o Fator II SNP G20210A.

Além disso, foi verificada a Especificidade Analítica para os seguintes SNP pouco usuais descritos na literatura científica. Existem SNP raros que se enquadram nas proximidades dos SNP de interesse:

Gene	SNP raro analisado
Fator V	G1689A, C1690T, A1692C, A1696G
Fator II	A20207C, A20218G, T20219A, C20221T
MTHFR	C678A, G679A, C684G

A Especificidade Analítica foi verificada usando ADN de plasmídeo contendo a região amplificada dos genes do Fator V, Fator II e MTHFR com o nucleótido de tipo selvagem nos SNP de interesse e o nucleótido mutante nos SNP raros em análise.

Foram usadas amostras simuladas contendo cerca de 80.000 cópias de ADN de plasmídeo em 6 réplicas para executar o procedimento de amplificação e deteção com o produto e o **ELITE InGenius**. Todas as réplicas foram consideradas "inconclusivas" ou corretamente determinadas. Nenhuma amostra mutada para SNP raros em análise foi designada de heterozigótica ou homozigótica mutada para o SNP de interesse.

SNP raros que se enquadram na região de hibridização da sonda podem interferir na deteção do SNP de interesse e originar um "mutante homozigótico falso" quando ocorrer em simultâneo com a mutação do SNP de interesse no outro alelo.

Organismos potencialmente interferentes: reatividade cruzada

A potencial reatividade cruzada com outros organismos que podem ser encontrados em amostras clínicas de plasma e sangue total foi avaliada pela comparação *in silico* das sequências disponíveis nas bases de dados de nucleótidos.

A análise da região amplificada das sequências do produto revelou a ausência de homologies significativas. Por conseguinte, não se prevê que haja reatividade cruzada por organismos potencialmente interferentes.

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

REF RTSD00ING

Organismos potencialmente interferentes: inibição

A ausência de inibição por outros organismos que podem ser encontrados em amostras clínicas de plasma e sangue total foi avaliada pela comparação *in silico* das sequências disponíveis nas bases de dados de nucleótidos.

A análise da região amplificada das sequências do produto revelou a ausência de homologies significativas. Por conseguinte, não se prevê que ocorra a inibição por organismos potencialmente interferentes.

Substâncias interferentes

O efeito de substâncias potencialmente interferentes foi avaliado através da análise da amostra de sangue total colhida em EDTA, heterozigótico para os três genes de interesse, reforçado com as potenciais substâncias interferentes seguintes: Bilirrubina 300 µg / mL, Triglicédeos 4 mg / mL, Heparina 8,3 µg / mL, 50 mM EDTA, Ibuprofeno 100 µg / mL, Ganciclovir 10 µg / mL, Ampicilina 18 µg / mL e Ciclosporina 0,3 µg / mL).

Foram usadas amostras reforçadas com substância e uma amostra de referência (não reforçada) para a realização de todo o procedimento de análise, extração e amplificação em 3 réplicas, com o produto e o **ELITe InGenius**. Todas as réplicas foram consideradas válidas e corretamente genotipadas.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte:

Amostra	Genótipo FV het / FII het / MTHFR het	CI Ct (valor-limite = 26.5)			Resultado
		réplicas			
		1	2	3	
Controlo	3 / 3	22,72	22,42	22,25	Sem interferência
Ciclosporina A	3 / 3	22,55	22,17	22,31	Sem interferência
Ganciclovir	3 / 3	22,47	22,87	22,35	Sem interferência
Heparina	3 / 3	22,31	22,67	22,31	Sem interferência
EDTA	3 / 3	23,27	23,46	23,41	Sem interferência
Ibuprofeno	3 / 3	24,98	23,77	23,59	Sem interferência
Triglicéridos	3 / 3	23,42	24,49	24,51	Sem interferência
Ampicilina	3 / 3	22,59	22,69	22,26	Sem interferência
Bilirrubina	3 / 3	22,73	22,61	22,35	Sem interferência

Repetibilidade

A Repetibilidade dos resultados obtidos pelo produto **Coagulation ELITe MGB Kit** em associação com os sistemas **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** foi testada através da análise de um painel de sangue total colhido em EDTA composto por 3 amostras:

- genótipo FII SNP G1691A heterozigótico (Leiden) (FV normal e MTHFR normal),
- genótipo FV SNP G20210A heterozigótico (FII normal e MTHFR normal),
- genótipo MTHFR SNP C677T heterozigótico (FII normal e FV normal),

A repetibilidade intra-sessão foi obtida através da análise de 3 amostras do painel, cada heterozigótico para o SNP de interesse de um gene, em 8 réplicas, em uma execução por dia, com o mesmo lote do produto, no mesmo instrumento, no mesmo dia. As amostras foram processadas em posições aleatórias no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

A repetibilidade inter-sessão foi obtida através da análise de 3 amostras do painel, cada heterozigótico para o SNP de interesse de um gene, em 8 réplicas, em uma execução por dia, com o mesmo lote do produto, no mesmo instrumento, em dois dias diferentes. As amostras foram processadas em posições aleatórias no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

Todas as réplicas foram consideradas válidas e corretamente determinadas. A variabilidade dos resultados obtidos foi calculada como uma %CV dos valores do Ct do IC e da Tm dos três genes de interesse.

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

REF RTSD00ING

Os resultados estão resumidos nas tabelas seguintes.

Repetibilidade intra-sessão no ELITe InGenius				
Amostra de painel	Alvo	N	Ct médio	%CV Ct
Heterozigótico para FII SNP G1691A	CI	8	22,07	0,41
Heterozigótico para FV SNP G20210A		8	22,91	0,76
Heterozigótico para MTHFR SNP C677T		8	22,02	1,22

Repetibilidade intra-sessão no ELITe InGenius				
Amostra de painel	Alelo	N	Tm média	%CV Tm
Heterozigótico para FII SNP G1691A	Fator II tipo selvagem	8	58,19	0,207
	Fator II mutado	8	65,66	0,051
Heterozigótico para FV SNP G20210A	Fator V tipo selvagem	8	55,18	0,048
	Fator V mutado	8	62,31	0,120
Heterozigótico para MTHFR SNP C677T	MTHFR tipo selvagem	8	56,73	0,183
	MTHFR mutado	8	65,90	0,169

Repetibilidade inter-sessão no ELITe InGenius				
Amostra de painel	Alvo	N	Ct médio	%CV Ct
Heterozigótico para FII SNP G1691A	CI	16	22,12	1,12
Heterozigótico para FV SNP G20210A		16	22,91	0,75
Heterozigótico para MTHFR SNP C677T		16	22,10	1,36

Repetibilidade inter-sessão no ELITe InGenius				
Amostra de painel	Alelo	N	Tm média	%CV Tm
Heterozigótico para FII SNP G1691A	Fator II tipo selvagem	16	58,18	0,182
	Fator II mutado	16	65,78	0,258
Heterozigótico para FV SNP G20210A	Fator V tipo selvagem	16	55,18	0,064
	Fator V mutado	16	62,31	0,116
Heterozigótico para MTHFR SNP C677T	MTHFR tipo selvagem	16	56,73	0,211
	MTHFR mutado	16	65,96	0,257

A repetibilidade no **ELITe InGenius** do produto **Coagulation ELITe MGB Kit** demonstrou valores Ct do IC com %CV menor que 5% e um valor da Tm dos três genes de interesse menor que 5%.

Repetibilidade intra-sessão no ELITe BeGenius				
Amostra de painel	Alvo	N	Ct médio	%CV Ct
Heterozigótico para FII SNP G1691A	CI	8	22,35	1,90
Heterozigótico para FV SNP G20210A		8	22,95	2,20
Heterozigótico para MTHFR SNP C677T		8	22,40	1,28

Repetibilidade intra-sessão no ELITe BeGenius				
Amostra de painel	Alelo	N	Tm média	%CV Tm
Heterozigótico para FII SNP G1691A	Fator II tipo selvagem	8	57,64	0,392
	Fator II mutado	8	65,21	0,150
Heterozigótico para FV SNP G20210A	Fator V tipo selvagem	8	54,84	0,120
	Fator V mutado	8	61,56	0,242
Heterozigótico para MTHFR SNP C677T	MTHFR tipo selvagem	8	56,29	0,174
	MTHFR mutado	8	65,30	0,116

Repetibilidade inter-sessão no ELITE BeGenius				
Amostra de painel	Alvo	N	Ct médio	%CV Ct
Heterozigótico para FII SNP G1691A	CI	16	22,26	1,58
Heterozigótico para FV SNP G20210A		16	23,10	2,02
Heterozigótico para MTHFR SNP C677T		16	22,45	1,75

Repetibilidade inter-sessão no ELITE BeGenius				
Amostra de painel	Alelo	N	Tm média	%CV Tm
Heterozigótico para FII SNP G1691A	Fator II tipo selvagem	16	57,71	0,494
	Fator II mutado	16	65,24	0,119
Heterozigótico para FV SNP G20210A	Fator V tipo selvagem	16	54,82	0,131
	Fator V mutado	16	61,60	0,218
Heterozigótico para MTHFR SNP C677T	MTHFR tipo selvagem	16	56,29	0,273
	MTHFR mutado	16	65,28	0,099

A repetibilidade no **ELITE BeGenius** do produto **Coagulation ELITE MGB Kit** demonstrou valores Ct do IC com %CV menor que 5% e um valor da Tm dos três genes de interesse menor que 5%.

Reprodutibilidade

A Reprodutibilidade dos resultados obtidos pelo produto **Coagulation ELITE MGB Kit** em associação com os sistemas **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** foi testada através da análise de um painel de sangue total colhido em EDTA composto por 3 amostras:

- genótipo FII SNP G1691A heterozigótico (Leiden) (FV normal e MTHFR normal),
- genótipo FV SNP G20210A heterozigótico (FII normal e MTHFR normal),
- genótipo MTHFR SNP C677T heterozigótico (FII normal e FV normal),

A reprodutibilidade interlote foi obtida através da análise de 3 amostras do painel, cada heterozigótico para o SNP de interesse de um gene, em 8 réplicas por dia com 2 lotes diferentes e no mesmo instrumento em 2 dias. As amostras foram processadas em posições aleatórias no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

A reprodutibilidade inter-instrumento foi obtida através da análise de 3 amostras do painel, cada heterozigótico para o SNP de interesse de um gene, em 8 réplicas por dia usando 2 instrumentos diferentes, por 2 operadores diferentes, em 2 dias. As amostras foram processadas em posições aleatórias no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

Todas as réplicas foram consideradas válidas e corretamente determinadas. A variabilidade dos resultados obtidos foi calculada como uma %CV dos valores do Ct do IC e da Tm dos três genes de interesse.

Os resultados estão resumidos nas tabelas seguintes.

Repetibilidade interlote no ELITE InGenius				
Amostra de painel	Alvo	N	Ct médio	CV% Ct
Heterozigótico para FII SNP G1691A	CI	16	22,28	1,28
Heterozigótico para FV SNP G20210A		16	22,46	2,58
Heterozigótico para MTHFR SNP C677T		16	23,14	1,47

Repetibilidade interlote no ELITE InGenius				
Amostra de painel	Alelo	N	Tm média	CV% Tm
Heterozigótico para FII SNP G1691A	Fator II tipo selvagem	16	58,1	0,23
	Fator II mutado	16	65,7	0,12
Heterozigótico para FV SNP G20210A	Fator V tipo selvagem	16	55,1	0,10
	Fator V mutado	16	62,3	0,13
Heterozigótico para MTHFR SNP C677T	MTHFR tipo selvagem	16	56,6	0,32
	MTHFR mutado	16	65,8	0,22

Reprodutibilidade inter-instrumento no ELITE InGenius				
Amostra de painel	Alvo	N	Ct médio	CV% Ct
Heterozigótico para FII SNP G1691A	CI	16	22,38	1,53
Heterozigótico para FV SNP G20210A		16	22,45	2,34
Heterozigótico para MTHFR SNP C677T		16	23,13	1,27

Reprodutibilidade inter-instrumento no ELITE InGenius				
Amostra de painel	Alelo	N	Tm média	CV% Tm
Heterozigótico para FII SNP G1691A	Fator II tipo selvagem	16	58,1	0,27
	Fator II mutado	16	65,6	0,12
Heterozigótico para FV SNP G20210A	Fator V tipo selvagem	16	55,1	0,21
	Fator V mutado	16	62,2	0,16
Heterozigótico para MTHFR SNP C677T	MTHFR tipo selvagem	16	56,6	0,35
	MTHFR mutado	16	65,7	0,28

A reprodutibilidade no **ELITE InGenius** do produto **Coagulation ELITE MGB Kit** demonstrou valores Ct do IC com %CV menor que 5% e um valor da Tm dos três genes de interesse menor que 5%.

Reprodutibilidade inter-lote no ELITe BeGenius				
Amostra de painel	Alvo	N	Ct médio	CV% Ct
Heterozigótico para FII SNP G1691A	CI	16	22,42	1,72
Heterozigótico para FV SNP G20210A		16	22,60	1,99
Heterozigótico para MTHFR SNP C677T		16	22,80	2,20

Reprodutibilidade inter-lote no ELITe BeGenius				
Amostra de painel	Alelo	N	Tm média	CV% Tm
Heterozigótico para FII SNP G1691A	Fator II tipo selvagem	16	57,6	0,29
	Fator II mutado	16	65,2	0,11
Heterozigótico para FV SNP G20210A	Fator V tipo selvagem	16	54,8	0,11
	Fator V mutado	16	61,5	0,24
Heterozigótico para MTHFR SNP C677T	MTHFR tipo selvagem	16	56,2	0,27
	MTHFR mutado	16	65,2	0,28

Reprodutibilidade inter-instrumento no ELITe BeGenius				
Amostra de painel	Alvo	N	Ct médio	CV% Ct
Heterozigótico para FII SNP G1691A	CI	16	22,51	1,60
Heterozigótico para FV SNP G20210A		16	22,63	1,68
Heterozigótico para MTHFR SNP C677T		16	23,15	1,83

Reprodutibilidade inter-instrumento no ELITe BeGenius				
Amostra de painel	Alelo	N	Tm média	CV% Tm
Heterozigótico para FII SNP G1691A	Fator II tipo selvagem	16	57,7	0,45
	Fator II mutado	16	65,2	0,13
Heterozigótico para FV SNP G20210A	Fator V tipo selvagem	16	54,8	0,16
	Fator V mutado	16	61,6	0,23
Heterozigótico para MTHFR SNP C677T	MTHFR tipo selvagem	16	56,2	0,30
	MTHFR mutado	16	65,3	0,17

A reprodutibilidade no **ELITe BeGenius** do produto **Coagulation ELITe MGB Kit** demonstrou um valor %CV de Ct da amplificação do IC menor que 5% e um valor da Tm dos três genes de interesse menor que 5%.

Robustez: Teste de contaminação cruzada

A ausência de contaminação cruzada foi verificada através da análise de amostras de sangue total alternadas com água de qualidade para biologia molecular.

Neste teste, foram alternadas 6 amostras de sangue total com 6 amostras de água, sendo usadas para realizar todo o procedimento de análise, extração e amplificação, com o produto **Coagulation ELITe MGB Kit** e **ELITe InGenius** em cinco sessões diferentes.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	Genótipo			CI
		Fil het	MTHFR wt	FV wt	Ct < 26,5
Sangue total colhido em EDTA	30	30/30	30/30	30/30	30/30
Água de qualidade para biologia molecular	30	N/A	N/A	N/A	0/30

O ensaio determina como “Inválida” qualquer amostra de água testada que apresente ausência de contaminação cruzada.

Concordância diagnóstica: confirmação do genótipo da amostra certificada

A concordância diagnóstica deste ensaio, bem como a capacidade de identificar corretamente o genótipo da amostra certificada, foram testados em amostras de sangue total clínico de indivíduos com genótipo conhecido e para genótipos homozigóticos mutados do Fator II SNP G20210A e MTHFR SNP locos C677T, em amostras simuladas.

Foi verificada a concordância diagnóstica usando 219 amostras de sangue total colhido em EDTA de diferentes indivíduos cujo genótipo foi determinado por ensaios PCR em tempo real de referência validada e 92 amostras simuladas com genótipo homozigótico mutado, preparado com misturas de ADN de plasmídeo em matriz plasmática.

As amostras foram testadas através do procedimento de extração e amplificação usando o produto e o **ELITe InGenius**.

Os resultados estão resumidos nas tabelas seguintes.

Genótipo da amostra: Fator V G1691A	N	WT	Het.	Hom.	Concordância do diagnóstico	Concordância total do diagnóstico
Tipo selvagem	108	108	0	0	100%	100%
Heterozigótico	57	0	57	0	100%	
Homozigótico mutado	53	0	0	53	100%	

Na discriminação alélica do Fator V SNP loco G1691A, ensaio devolveu resultados concordantes para todas as amostras testadas. Neste teste, a concordância diagnóstica total para o Fator V SNP loco G1691A foi correspondente a 100%.

Genótipo da amostra: Fator II G20210A	N	WT	Het.	Hom.	Concordância do diagnóstico	Concordância total do diagnóstico
Tipo selvagem	160	160	0	0	100%	100%
Heterozigótico	59	0	59	0	100%	
Homozigótico mutado (simulado)	56	0	0	56	100%	

Na discriminação alélica do Fator II SNP loco G20210A, ensaio devolveu resultados concordantes para todas as amostras testadas. Neste teste, a concordância diagnóstica total para o Fator II loco G20210A foi correspondente a 100%.

Genótipo da amostra: MTHFR C677T	N	WT	Het.	Hom.	Concordância do diagnóstico	Concordância total do diagnóstico
Tipo selvagem	63	63	0	0	100%	100%
Heterozigótico	136	0	136	0	100%	
Homozigótico mutado	19	0	0	19	100%	
Homozigótico mutado (simulado)	36	0	0	36		

Na discriminação alélica do MTHFR SNP loco C677T, ensaio devolveu resultados concordantes para todas as amostras testadas. Neste teste, a concordância diagnóstica total para o MTHFR loco C677T foi correspondente a 100%.

Dado que o **ELITe BeGenius** tem desempenhos analíticos equivalentes ao **ELITe InGenius**, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, os desempenhos de diagnóstico do ensaio obtido em associação com o **ELITe InGenius** também se aplicam ao **ELITe BeGenius**.

O valor-limite da Ct do controlo interno (Ct CI) está definido para 26,5 para o **ELITe InGenius** e o **ELITe BeGenius**.

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 "Coagulation ELITe MGB Kit", FTP RTSD00ING.

REFERÊNCIAS

Voorberg, J. et al. (1994) *The Lancet* **343**: 1535 - 1536.
Baker, R. et al. (1994) *The Lancet* **344**: 1162.
Poort, S. R. et al. (1996) *Blood* **88**: 3698 - 3703.
Kluijtmans L. A. et al. (1996) *Am J Hum Genet* **58**: 35 - 41.
Cattaneo M. et al. (1997) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **17**: 1662-1666.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Use este produto apenas com amostras clínicas de sangue total colhidas em EDTA.
Não existem dados disponíveis relativos aos desempenhos do produto com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: saliva.

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 o uso de vestuário especial e instrumentos específicos para preparação da sessão de trabalho, para evitar falsos resultados positivos.

Um resultado inválido ou inconclusivo obtido com este produto significa que não é possível detetar com eficácia o ADN genómico da amostra ou as temperaturas de dissociação dos alelos. Neste caso, a análise da amostra tem de ser repetida com um possível atraso na obtenção dos resultados.

Possíveis polimorfismos na região do ADN alvo abrangidos pelos primários do produto e as sondas podem prejudicar a deteção do ADN alvo e originar resultados incorretos.

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, inconclusivos e resultados incorretos 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. No entanto, este risco residual associado à utilização prevista do produto foi ponderado em relação aos potenciais benefícios para o paciente e foi considerado aceitável.

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.	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 Extraction Area, 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 ou inconclusiva	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da PCR Mix e da amostra. Verifique os volumes da PCR Mix e da amostra.
Degradação da PCR Mix.	Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Substâncias interferentes na amostra.	Repita a amplificação com uma diluição 1: 2 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR only".
A quantidade de ADN na amostra é insuficiente.	Repita a extração e amplificação com uma nova alíquota de amostra numa sessão "Extração + PCR".
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Erro 30103	
Causas possíveis	Soluções
Concentração demasiado alta do alvo na amostra.	Repita a reação de amplificação da amostra com uma diluição 1:10 de amostra eluída em água para biologia molecular numa sessão no modo "apenas PCR".

Erro TH, Erro SDM, Erro Ct	
Causas possíveis	Soluções
Amostra com formato anómalo do traçado.	Repita a reação de amplificação da amostra com uma diluição 1:10 de amostra eluída em água para biologia molecular numa sessão no modo "apenas PCR".

SÍMBOLOS



Número do catálogo.



Limite máximo da temperatura.



Código do lote.



Usar até (último dia do mês).



Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*.



Cumprimento dos requisitos da Regulamentos IVDR 2017/746/CE relativo a dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*. Certificação emitida pela TÜV Süd Product Service GmbH, Alemanha.



Identificação única do dispositivo



Contém suficiente para "N" testes.



Atenção, consulte as instruções de utilização.



Conteúdo.



Manter afastado da luz solar.



Fabricante.

NOTIFICAÇÃO PARA OS UTILIZADORES

Qualquer incidente grave ocorrido relacionado com o dispositivo deve ser comunicado ao fabricante e às autoridades competentes do Estado-Membro em que o utilizador e/ou o doente se encontram localizados. No momento da revisão atual das IU, não ocorreram incidentes graves ou a retirada do mercado do dispositivo.

Um "Resumo da segurança e desempenho" será disponibilizado ao público através da base de dados europeia para dispositivos médicos (Eudamed) quando este sistema informático estiver operacional. Antes da notificação de total funcionalidade da Eudamed ter sido publicada, o "Resumo da Segurança e Desempenho" foi disponibilizado ao público mediante pedido em tempo útil.

NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA

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

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

ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® são tecnologia protegida por patentes e sujeita a pedidos de patentes.

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 licenciamentos concedem quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, para quaisquer outros fins.

ELITe MGB®, o logótipo ELITe MGB®, ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® estão registados pelo ELITechGroup como marcas comerciais na União Europeia.

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

Coagulation ELITE MGB® kit used with ELITE InGenius and ELITE BeGenius

Ref: RTSD00ING



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

A. Intended use

The product **Coagulation ELITE MGB® Kit** is an *in vitro* diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as qualitative nucleic acids Real-Time PCR assay for the allelic discrimination of the following three loci in human genomic DNA samples extracted from clinical specimens:

- coagulation Factor V gene, single nucleotide polymorphism (SNP) G1691A (Leiden),
- coagulation Factor II gene, SNP G20210A,
- 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, SNP C677T.

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

The product is intended for use as an aid in assessing the risk of deep vein thrombosis in patients suspected of having coagulation disorders and at risk of deep vein thrombosis.

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

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
SNP G1691A (Leiden)	Factor V	AP639
SNP G20210A	Factor II	FAM
SNP C677T	MTHFR	AP593
Internal Control	Human beta Globin gene	AP525

C. Validated matrix

Whole Blood collected in EDTA.

D. Kit content

52M PCR Mix



X 8

Ready-to-use PCR Master Mix
8 tubes of 280 µL
96 reactions per kit
7 freeze-thaw cycles per tube

Storage temperature: - 20°C or below

E. Material required not provided in the kit

- › **ELITE InGenius** instrument: INT030
- › **ELITE BeGenius** instrument: INT040
- › **ELITE InGenius SP200** extraction cartridge: INT032SP200
- › **ELITE InGenius PCR Cassette** amplification cartridge: INT035PCR
- › **ELITE InGenius SP200 Consumable Set** consumable for extraction: INT032CS
- › **Coagulation - ELITE Positive Control**: CTRD00ING
- › **ELITE InGenius Waste Box**: F2102-000
- › **300 µL Filter Tips Axygen**: TF-350-L-R-S with ELITE InGenius only
- › **1000 µL Filter Tips Tecan**: 30180118 with ELITE BeGenius only

F. Protocol

- | | | | |
|---------------------------|--------|-------------------------------|----------------|
| › Sample volume | 200 µL | › Unit of quantitative result | Not Applicable |
| › Total eluate volume | 200 µL | › Frequency of controls | 15 days |
| › PCR eluate input volume | 20 µL | › Frequency of calibration | Not Applicable |
| › Q-PCR Mix volume | 20 µL | | |

G. Performance

Target	Limit of Detection	Total Diagnostic Agreement
Factor V SNP G1691A	70ng DNA/reaction	100%
Factor II SNP G20210A	70ng DNA/reaction	100%
MTHFR SNP C677T	70ng DNA/reaction	100%

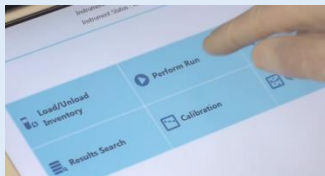
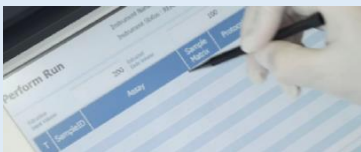
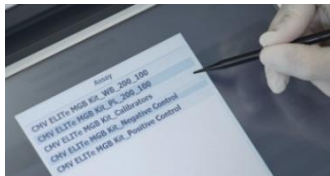
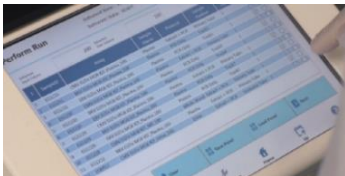
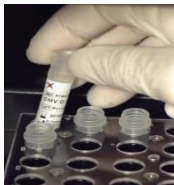
H. Procedures ELITE InGenius

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

Before analysis

1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"	2. Verify controls: 52M positive and negative controls in the "Control menu" <i>N.B:</i> Both have been run, approved and not expired	3. Thaw the 52M-PCR-Mix tube Vortex gently Spin down 5 sec
---	--	--

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen 	2. Verify the extraction volume: Input: "200 µL", eluate: "200 µL" 	3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID 
4. Select the "Assay protocol" of interest 	5. Select the sample position: Primary tube or extraction tube 	6. Load the PCR Mix in the inventory block 
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, extraction tube and primary sample racks 	8. Close the door Start the run 	9. View, approve and store the results 

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the protocol “Extraction Only” and set the sample position: Primary tube or Secondary tube	6. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, extraction tube and primary sample racks
7. Close the door Start the run	8. Archive the eluate sample	

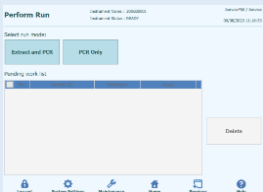
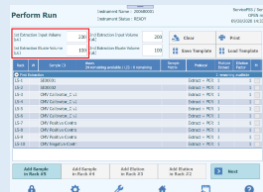
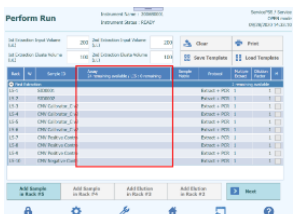
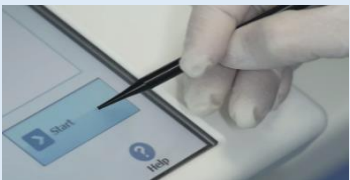
I. Procedures ELiTe BeGenius

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

Before analysis

1. Switch on ELiTe BeGenius. Log in with username and password. Select the mode “Closed”.	2. Verify controls: 52M Positive Control and 52M Negative Control in the “Controls” menu. <i>Note:</i> Both must have been run, approved and not expired.	3. Thaw the 52M PCR Mix tube. Vortex gently. Spin down 5 sec.
--	---	--

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select “Perform Run” on the touch screen and then click on the run mode «Extraction and PCR» 	2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active 	3. Verify the extraction volumes: Input: “200 µL”, Eluate: “200 µL” 
4. Select the “Assay protocol” of interest 	5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area 	6. Load the Q-PCR-Mix in Reagent Rack and insert it in the cooling area 
7. Load: Filter Tips, Extraction rack, and PCR rack 	8. Close the door. Start the run 	9. View, approve and store the results 

Note: if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the protocol “Extraction Only” in the Assay Protocol selection screen.	6. Load : Filter Tips and the Extraction Rack
7. Close the door Start the run	8. Archive the eluate sample	