

Instruções de utilização

AltoStar[®] HAV RT-PCR Kit 1.5

12/2025 PT

AltoStar[®]

HAV RT-PCR Kit 1.5

Para utilização com

ABI Prism[®] 7500 SDS (Applied Biosystems)

CFX96[™] Deep Well Dx System (Bio-Rad)

CFX96[™] Dx System (Bio-Rad)

LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche)

QuantStudio[™] 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

Rotor-Gene[®] Q5/6 plex Platform (QIAGEN)



AS0241543



96



12 2025



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12
22767 Hamburg • Germany

Índice

1.	Sobre estas instruções de utilização	8
2.	Utilização prevista	9
3.	Componentes do kit	10
3.1	Reagentes	10
3.2	Plug-in de ensaio do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5	11
4.	Armazenamento e manuseamento	11
4.1	Armazenamento	11
4.2	Manuseamento.....	12
4.2.1	Master A e Master B	13
4.2.2	Positive Control (controlo positivo) e No Template Control (controlo negativo).....	13
5.	Descrição do produto	13
5.1	Informação de base.....	14
5.2	Descrição do reagente	15
5.2.1	Master A e Master B	15
5.2.2	Positive Control (controlo positivo).....	15
5.2.3	No Template Control (controlo negativo)	15
5.3	Ordens das tarefas	16
5.3.1	AltoStar® Workflow (ordem das tarefas).....	16
5.3.2	Outras ordens das tarefas.....	17
5.4	Amostras	17
5.4.1	Tipos de amostras	17
5.4.2	Recolha e manuseamento de amostras.....	18
6.	Advertências, precauções e limitações	19

7.	Utilizar o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 com a AltoStar®	
	Workflow (ordem das tarefas).....	21
7.1	Volume de amostra.....	22
7.2	Tubos de amostra.....	22
7.3	Códigos de barras da amostra	22
7.4	Materiais e dispositivos necessários mas não fornecidos para a AltoStar® Workflow (ordem das tarefas).....	23
7.5	Materiais e dispositivos gerais.....	24
7.6	Procedimento	25
7.6.1	Perspetiva geral da AltoStar® Workflow (ordem das tarefas)	25
7.6.2	Programar um AltoStar® run (processamento)	32
7.6.3	Iniciar um processamento de configuração PCR	32
7.6.3.1	Preparação de reagentes para um processamento de configuração PCR	34
7.6.3.2	Carregar o AltoStar® AM16 para um processamento de configuração PCR	34
7.6.3.3	Durante o processamento de configuração PCR.....	38
7.6.4	Conclusão do processamento de configuração PCR.....	38
7.6.4.1	Resultados do processamento de configuração PCR.....	39
7.6.5	Selagem da placa PCR	41
7.6.5.1	Estabilidade da mistura PCR	43
7.6.6	Iniciar um processamento PCR.....	43
7.6.6.1	Durante o processamento PCR	44
7.6.7	Análise de dados PCR utilizando o CFX Manager™ Dx software	45
7.6.7.1	Atribuição de ensaios a grupos de poços	46
7.6.7.2	Correção da linha de base	50
7.6.7.3	Exclusão de sinais irregulares PCR	52
7.6.7.4	Definição de limiares	56
7.6.8	Validade dos resultados PCR.....	60

7.6.8.1	Exclusão de poços com dados inválidos.....	60
7.6.8.2	Validade de um processamento PCR de diagnóstico	63
7.6.8.3	Validade dos resultados para uma amostra	63
7.6.9	Exportação de resultados PCR para a interpretação de resultados executada por LIMS	64
7.6.10	Exportação de resultados PCR para a interpretação manual de resultados.....	65
7.6.10.1	Interpretação manual dos resultados.....	66
7.6.11	Análise de dados PCR e interpretação automatizada de resultados utilizando o FastFinder	68
8.	Utilizar o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 com outros instrumentos PCR em tempo real que não sejam o CFX96™ Deep Well Dx System	69
8.1	Materiais e dispositivos necessários mas não fornecidos.....	69
8.2	Procedimento	70
8.2.1	Preparação de amostras	70
8.2.2	Preparação da master mix	71
8.2.3	Preparação da reação.....	72
8.2.4	Processamento PCR.....	73
8.2.4.1	Programação do instrumento PCR em tempo real	73
8.2.4.2	Definições de processamento	73
8.2.5	Análise de dados	74
9.	Dados de desempenho.....	75
9.1	Plasma.....	76
9.1.1	Sensibilidade analítica.....	76
9.1.2	Especificidade analítica	77
9.1.2.1	Amostras negativas.....	78
9.1.2.2	Substâncias interferentes.....	78
9.1.2.3	Reatividade cruzada.....	79

9.1.3	Reatividade.....	80
9.1.4	Precisão.....	80
9.1.5	Taxa de insucesso total	83
9.1.6	Transferência.....	84
9.1.7	Desempenho clínico.....	84
10.	Eliminação	85
11.	Controlo de qualidade	86
12.	Apoio técnico	86
13.	Resumo de segurança e desempenho.....	86
14.	Bibliografia	87
15.	Marcas comerciais e isenções de responsabilidade.....	87
16.	Símbolos	88
17.	Protocolo de ensaio para o AltoStar® Connect software e informação para a integração LIMS	90
18.	Histórico de revisões.....	92

1. Sobre estas instruções de utilização

Estas instruções de utilização orientam o utilizador na utilização do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5. Os capítulos 1–6 e 9–14 contêm informações gerais e instruções que se aplicam a cada ordem de tarefas utilizada com o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5. O capítulo 7 dá instruções sobre a forma de utilizar o produto com o AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automação) (Hamilton; doravante sintetizado como AltoStar® AM16) com o AltoStar® Connect software (versão 1.7.4 ou superior, Hamilton) para configuração PCR automatizada e no CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad, doravante sintetizado como CFX96™ DW Dx) com o CFX Manager™ Dx software (versão 3.1, Bio-Rad) para PCR em tempo real. O capítulo 8 dá instruções sobre a forma de utilizar o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 em conjunto com outros e instrumentos PCR em tempo real. Para pormenores sobre a utilização do AltoStar® AM16, do AltoStar® Connect software, do kit AltoStar® Purification Kit 1.5, do AltoStar® Internal Control 1.5 e do CFX96™ DW Dx, consulte as respetivas instruções de utilização indicadas abaixo:

- AltoStar® Automation System AM16 Manual IVD do Operador (Hamilton)
- AltoStar® Connect Software Manual IVD (Hamilton)
- Instruções de utilização AltoStar® Purification Kit 1.5
- Instruções de utilização AltoStar® Internal Control 1.5
- Sistemas CFX96™ Dx e CFX96™ Deep Well Dx Manual de operação (Bio-Rad)

Ao longo deste manual, os termos ATENÇÃO e NOTA têm os seguintes significados:

ATENÇÃO



Destaca os procedimentos ou as instruções de funcionamento que, se não forem seguidos corretamente, podem resultar em lesões pessoais ou afetar o desempenho do produto. Contacte o apoio técnico da Altona Diagnostics para obter assistência.

NOTA



Consiste em informações úteis para o utilizador mas que não são essenciais para a tarefa em questão.

Leia as instruções de utilização cuidadosamente antes de utilizar o produto.

2. Utilização prevista

O kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 consiste num teste de diagnóstico *in vitro*, baseado em tecnologia PCR em tempo real, para a deteção qualitativa de ARN específico do vírus da hepatite A (HAV) (genótipos I–III) em plasma humano tratado com EDTA e citrato. Destina-se a ser utilizado como uma ajuda ao diagnóstico de infeção por HAV.

Os resultados obtidos com o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 têm de ser interpretados juntamente com outros dados clínicos e laboratoriais.

O kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 destina-se a ser utilizado por profissionais com formação em técnicas de biologia molecular e procedimentos de diagnóstico *in vitro*.

3. Componentes do kit

O AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 é composto por uma caixa com reagentes e o plug-in de ensaio do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.

3.1 Reagentes

A caixa do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 contém os seguintes componentes:

Tabela 1: Componentes do kit

Cor da tampa	Componente	Número de tubos	Volume nominal [µl/tubo]
Azul	Master A ¹⁾	8	60 ²⁾
Violeta	Master B ¹⁾	8	180 ³⁾
Vermelho	PC ⁴⁾	2	250
Branco	NTC ⁵⁾	2	250

¹⁾ Contém material biológico de origem animal

²⁾ Contém um volume adicional de 25 µl para compensar o volume morto de manuseamento de líquidos do AltoStar® AM16

³⁾ Contém um volume adicional de 55 µl para compensar o volume morto de manuseamento de líquidos do AltoStar® AM16

⁴⁾ Positive Control (controlo positivo)

⁵⁾ No Template Control (controlo negativo)

ATENÇÃO



Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente à integralidade quanto ao número, tipo e conteúdos. Não utilize um produto defeituoso ou incompleto, o desempenho do produto poderia ficar comprometido.

O kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 contém reagentes suficientes para realizar 96 reações num número máximo de 8 processamentos.

A caixa do kit é enviada em gelo seco. No momento da entrega e antes da primeira utilização, verifique a caixa do kit e os respectivos componentes relativamente a:

- Integridade
- Integralidade quanto ao número, tipo e conteúdos
- Etiquetagem correta
- Data de validade
- Estado congelado
- Limpeza e ausência de partículas

Se um ou mais componentes do produto não estiverem congelados no momento da receção, se os tubos tiverem ficado comprometidos durante o envio ou estiverem em falta, contacte o apoio técnico da Altona Diagnostics para obter assistência (consulte o capítulo 12. Apoio técnico).

3.2 Plug-in de ensaio do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5

O plug-in de ensaio AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 versão 1.0 pode ser usado opcionalmente em combinação com o software FastFinder Standalone para realizar a análise de dados e a interpretação automatizada de resultados. Não é fornecido com os reagentes do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 e deve ser encomendado separadamente como parte do AltoStar® Automated Analysis Package (N.º de encomenda VK000045).

4. Armazenamento e manuseamento

Todos os reagentes incluídos no kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 são soluções prontas a usar.

4.1 Armazenamento

Todos os reagentes do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 têm de ser armazenados entre -25 °C e -15 °C no momento da chegada.

ATENÇÃO



Condições de armazenamento incorretas podem comprometer o desempenho do produto.

ATENÇÃO



Não utilize produtos para além da data de validade. A utilização de produtos expirados pode comprometer o desempenho do produto.

4.2 Manuseamento

ATENÇÃO



Não ultrapasse a sequência descongelar-congelar e a duração de manuseamento conforme especificado nestas instruções de utilização, pois tal poderia comprometer o desempenho do produto.

ATENÇÃO



O manuseamento incorreto de componentes e amostras do produto poderá causar contaminação e pode comprometer o desempenho do produto:

- Não troque tampas de frascos ou garrafas.
- Armazene o material positivo e/ou potencialmente positivo separado dos componentes do kit.
- Utilize áreas de trabalho separadas para a preparação da amostra/preparação da reação e as atividades de amplificação/deteção.
- Elimine sempre as luvas após manusear material positivo e/ou potencialmente positivo.
- Não abra as placas PCR e/ou tubos após a amplificação.

ATENÇÃO



Não misture componentes de lotes de kits diferentes. A utilização de lotes de kits diferentes pode comprometer o desempenho do produto.

4.2.1 Master A e Master B

Após a descongelação, o Master A e o Master B mantêm-se estáveis durante 5 horas a uma temperatura até +30 °C.

NOTA



Se o Master A e o Master B forem descongelados mas não utilizados, podem ser novamente congelados e descongelados para processamentos posteriores. No caso de abertura, elimine as tampas e utilize tampas novas para evitar a contaminação dos reagentes.

4.2.2 Positive Control (controlo positivo) e No Template Control (controlo negativo)

1. Após a descongelação, o Positive Control (PC, controlo positivo) e o No Template Control (NTC, controlo negativo) mantêm-se estáveis durante 5 horas até +30 °C.
2. Elimine as tampas dos tubos PC e NTC a cada utilização e utilize tampas novas para evitar a contaminação dos reagentes.
3. Após a utilização, feche os tubos PC e NTC com tampas novas e congele-os imediatamente.
4. Não ultrapasse a seguinte sequência descongelar-congelar para cada tubo PC e NTC: *Descongelar 1 → Congelar 1 → Descongelar 2 → Congelar 2 → Descongelar 3 → Congelar 3 → Descongelar 4*

5. Descrição do produto

O kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 consiste num teste de diagnóstico *in vitro* para a deteção qualitativa de ARN específico de HAV em plasma humano tratado com EDTA e citrato.

Baseia-se em tecnologia RT-PCR em tempo real, utilizando a reação da transcriptase reversa (RT) para converter ARN em ADN complementar (cADN), a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação de sequências-alvo específicas de HAV e das sondas específicas para o alvo com marcação fluorescente para a deteção do ADN amplificado.

Para além dos sistemas de deteção e amplificação de ARN específico do HAV, que têm como alvo a região gs1, gp1, gp2 (região de junção 3C/3D da poliproteína) do genoma viral, o ensaio inclui oligonucleótidos para a amplificação e deteção do controlo interno (doravante abreviado como IC; AltoStar® Internal Control 1.5).

A sonda específica para o ARN do HAV está marcada com o fluoróforo FAM™. A sonda específica para o IC está marcada com um fluoróforo (JOE™) detetável no canal VIC™, por exemplo.

A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a deteção paralela do ARN específico do HAV e do IC nos canais de deteção correspondentes do instrumento PCR em tempo real utilizado.

5.1 Informação de base

O vírus da hepatite A (HAV) é um de cinco vírus da hepatite que infetam os seres humanos. Pertence à família *Picornaviridae* e ao género *Hepatovirus*. Consiste num vírus icosaédrico sem invólucro, cujo genoma é composto por um ARN linear de cadeia simples e sentido positivo (ssRNA). A dimensão total do genoma de HAV tem aproximadamente 7,5 kb de comprimento.

O HAV é transmitido principalmente pela via fecal-oral através de infeção por contacto com superfícies contaminadas. Normalmente é propagado bebendo água contaminada ou ingerindo alimentos contaminados (como marisco), assim como através de contacto direto com uma pessoa já infetada. O vírus está presente a nível mundial. Nos países em desenvolvimento, praticamente todas as pessoas têm um risco elevado de infeção e tiveram contacto com o HAV durante a infância. Nas regiões desenvolvidas mais industrializadas, como a Europa e a América do Norte, o risco de infeção é muito menor uma vez que os padrões sanitários são melhores. Na sequência de infeção por HAV, obtém-se imunidade permanente.

Após a infeção, os primeiros sintomas manifestam-se ao fim de 14–28 dias. Os sintomas típicos são febre, mal-estar geral, perda de apetite, diarreia, náuseas, urina de cor escura e icterícia. As crianças que são infetadas muitas vezes não apresentam sintomas ou apresentam apenas sintomas ligeiros. Os adultos, contudo, apresentam muitas vezes sintomas (graves). Em geral a mortalidade é baixa e as infeções com o HAV não se transformam numa doença crónica do fígado. Não se conhece nenhum tratamento terapêutico para a infeção por HAV, mas a vacinação preventiva é possível [1,2].

5.2 Descrição do reagente

5.2.1 Master A e Master B

Master A e Master B contêm todos os componentes (tampão PCR, transcriptase reversa, polimerase do ADN, sais de magnésio, primers e sondas) necessários para permitir a transcrição reversa, assim como a amplificação mediada por PCR e a deteção alvo do ARN específico do HAV e do IC numa preparação de reação.

5.2.2 Positive Control (controlo positivo)

O PC contém concentrações padrão do ARN específico do HAV. É calibrado segundo a Norma Internacional da OMS «3rd WHO International Standard for Hepatitis A Virus VL For Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 15/276)». O PC é utilizado para verificar a funcionalidade dos sistemas de deteção e amplificação específicos do HAV incluídos no kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.

5.2.3 No Template Control (controlo negativo)

O NTC não contém ARN específico do HAV, mas contém o modelo de IC. O NTC é utilizado como controlo negativo para a RT-PCR em tempo real específica do ARN do HAV e indica a possível contaminação do Master A e do Master B.

5.3 Ordens das tarefas

5.3.1 AltoStar® Workflow (ordem das tarefas)

A AltoStar® Workflow (ordem das tarefas) inclui os seguintes produtos:

- AltoStar® Automation System AM16 (Hamilton)
- AltoStar® Connect software versão 1.7.4 ou superior (Hamilton)
- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad) com CFX Manager™ Dx software versão 3.1 (Bio-Rad)
- *Opcional:* FastFinder Standalone versão 1.0 ou superior (UgenTec NV) e o plugin de ensaio do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 para análise de dados e interpretação automatizada de resultados. A versão válida do plugin de ensaio está especificada no capítulo 3.2 Plug-in de ensaio do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.

A ordem das tarefas inclui os seguintes passos:

1. Programar um AltoStar® run (processamento).
2. Processamento de purificação no AltoStar® AM16 utilizando o kit AltoStar® Purification Kit 1.5 e o AltoStar® Internal Control 1.5 (controlo interno).
3. Processamento de configuração RT-PCR no AltoStar® AM16 utilizando o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.
4. Processamento RT-PCR em tempo real num CFX96™ DW Dx.

Para mais pormenores sobre os passos 3 e 4 da ordem de tarefas, consulte o capítulo 7. Utilizar o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 com a AltoStar® Workflow (ordem das tarefas). Todos os tipos de amostras e volumes de amostras especificados para utilizar com o kit AltoStar® Purification Kit 1.5 podem ser processados em simultâneo no AltoStar® AM16. Cada amostra pode ser analisada com tantos ensaios PCR em tempo real em paralelo quanto o eluato disponível permita.

NOTA



Os ensaios com perfis de temperatura PCR diferentes são ordenados automaticamente para separar placas PCR.

5.3.2 Outras ordens das tarefas

O kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 pode ser utilizado com ordens das tarefas compatíveis. Os seguintes instrumentos e software de PCR em tempo real foram validados para utilização com o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5:

- ABI Prism® 7500 SDS e 7500 Software v2.3 (Applied Biosystems)
- CFX96™ Deep Well Dx System e o CFX Manager™ Dx software versão 3.1 (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx System e o CFX Manager™ Dx software versão 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II e LightCycler® 480 Software versão 1.5.1 (Roche)
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System e QuantStudio™ 5 Dx Software v1.0.2 (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform e Rotor-Gene® Q Software versão 2.3.1 (QIAGEN)

Utilizando um dos instrumentos PCR em tempo real indicados acima (excepto para o CFX96™ Deep Well Dx System), a configuração PCR, a programação do instrumento, bem como a análise de dados têm de ser realizadas manualmente (para mais pormenores, consulte os capítulos 8.2.2 Preparação da master mix a 8.2.5 Análise de dados).

5.4 Amostras

5.4.1 Tipos de amostras

Os seguintes tipos de amostras podem ser utilizados com o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5:

- Plasma EDTA humano
- Plasma com citrato humano

ATENÇÃO



Este teste apenas foi validado para utilização com plasma humano tratado com EDTA e citrato. A utilização de outros tipos de amostras pode comprometer o desempenho do produto.

5.4.2 Recolha e manuseamento de amostras

O sangue tem de ser recolhido com sistemas de recolha de sangue disponíveis no mercado (p. ex.: Sarstedt, Becton Dickinson, Greiner ou equivalentes). Os conteúdos dos tubos devem ser misturados diretamente após a recolha de amostras. As amostras de sangue devem ser enviadas refrigeradas entre +2 °C e +8 °C. O transporte deve ser realizado de acordo com as instruções locais e nacionais relativas ao transporte de materiais biológicos.

Para geração de plasma tratado com EDTA ou citrato, o sangue total deve ser centrifugado de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante do sistema de recolha no prazo de 24 horas após a recolha. Antes da utilização, o plasma tratado com EDTA ou citrato não deve ser armazenado durante mais de 48 horas à temperatura ambiente (entre +20 °C e +25 °C), 5 dias a uma temperatura entre +2 °C e +8 °C ou 2 meses a uma temperatura entre -25 °C e -15 °C.

ATENÇÃO



As amostras devem ser sempre tratadas como sendo infecciosas e com risco (biológico), em conformidade com os procedimentos laboratoriais e de segurança. No caso de derrames de material da amostra, utilize imediatamente um desinfetante apropriado. Manuseie os materiais contaminados como se se tratassem de materiais com risco biológico.

ATENÇÃO



A colheita, envio, armazenamento ou preparação inadequados de amostras podem comprometer o desempenho do produto.

NOTA

O armazenamento congelado de amostras não compromete o desempenho do kit. Ao trabalhar com amostras congeladas, certifique-se de que as amostras estão totalmente descongeladas e devidamente misturadas antes da utilização.

6. Advertências, precauções e limitações

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente à integralidade quanto ao número, tipo e conteúdos. Não utilize um produto defeituoso ou incompleto, o desempenho do produto poderia ficar comprometido.
- Condições de armazenamento incorretas podem comprometer o desempenho do produto.
- Não utilize produtos para além da data de validade. A utilização de produtos expirados pode comprometer o desempenho do produto.
- Não ultrapasse a sequência descongelar-congelar e a duração de manuseamento conforme especificado nestas instruções de utilização, pois tal poderia comprometer o desempenho do produto.
- O manuseamento incorreto de componentes e amostras do produto poderá causar contaminação e pode comprometer o desempenho do produto:
 - Não troque tampas de frascos ou garrafas.
 - Armazene o material positivo e/ou potencialmente positivo separado dos componentes do kit.
 - Utilize áreas de trabalho separadas para a preparação da amostra/preparação da reação e as atividades de amplificação/deteção.
 - Elimine sempre as luvas após manusear material positivo e/ou potencialmente positivo.
 - Não abra as placas PCR e/ou tubos após a amplificação.
- Não misture componentes de lotes de kits diferentes. A utilização de lotes de kits diferentes pode comprometer o desempenho do produto.
- Este teste apenas foi validado para utilização com plasma humano tratado com EDTA e citrato. A utilização de outros tipos de amostras pode comprometer o desempenho do produto.

- As amostras devem ser sempre tratadas como sendo infecciosas e com risco (biológico), em conformidade com os procedimentos laboratoriais e de segurança. No caso de derrames de material da amostra, utilize imediatamente um desinfetante apropriado. Manuseie os materiais contaminados como se se tratassem de materiais com risco biológico.
- A colheita, envio, armazenamento ou preparação inadequados de amostras podem comprometer o desempenho do produto.
- O armazenamento de eluatos nas condições erradas poderá provocar a degradação da sequência-alvo do HAV, o que poderia comprometer o desempenho do produto.
- Não utilize uma versão do protocolo de ensaio que não seja a indicada no código de barras 2D nestas instruções de utilização. A utilização de uma versão incorreta do protocolo de ensaio poderia comprometer o desempenho do produto.
- A falta de centrifugação dos componentes do produto após a descongelação poderá provocar contaminação com resíduos de reagentes nas tampas, o que poderia comprometer o desempenho do produto.
- Não reutilize tampas de tubos para evitar a contaminação dos reagentes, pois tal poderia comprometer o desempenho do produto.
- À semelhança de qualquer outro teste de diagnóstico, os resultados devem ser interpretados tendo em consideração todos os dados clínicos e laboratoriais.
- A presença de inibidores de PCR (por ex., heparina) poderia causar resultados inválidos ou falsos negativos.
- Não utilize volumes diferentes de Master A e Master B para a preparação da master mix que não sejam os especificados nestas instruções de utilização, pois tal poderia comprometer o desempenho do produto.
- Não exceda o tempo de armazenamento da mistura PCR, pois tal poderia comprometer o desempenho do produto.
- Não misture amostras ou ID de amostras durante a configuração PCR ou transferência para o instrumento PCR. Tal poderia conduzir a resultados falsos positivos ou falsos negativos devido à atribuição incorreta das amostras.
- Não utilize outras condições de realização do ciclo que não sejam as especificadas nestas instruções de utilização, pois tal poderia comprometer o desempenho do produto.
- Não utilize outras definições de controlo para análise de dados que não sejam as especificadas nestas instruções de utilização, uma vez que tal poderia causar resultados de exames IVD incorretos.

- No caso de a amostra conter outros agentes patogénicos que não o HAV, poderá haver concorrência com a amplificação alvo ou reatividades cruzadas, causando resultados de exames IVD incorretos.
- A eliminação de resíduos perigosos e biológicos deve cumprir os regulamentos nacionais e locais para evitar a contaminação ambiental.
- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma do HAV abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar em na incapacidade de deteção da presença do agente patogénico.
- Este produto não se destina a ser utilizado para detetar a presença de HAV no sangue, componentes sanguíneos, células, tecidos, órgãos ou qualquer dos seus derivados para avaliar a sua adequação para transfusão, transplante ou administração celular.

7. Utilizar o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 com a AltoStar® Workflow (ordem das tarefas)

A parte seguinte destas instruções de utilização descreve a utilização do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 em conjunto com a AltoStar® Workflow (ordem das tarefas). A AltoStar® Workflow (ordem das tarefas) inclui diferentes produtos [o AltoStar® AM16, o AltoStar® Connect software, o kit AltoStar® Purification Kit 1.5, o AltoStar® Internal Control 1.5 (controlo interno), o CFX96™ DW Dx, o FastFinder Standalone e o plug-in de ensaio do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 para análise de dados e interpretação automatizada de resultados (opcional)]. A utilização desses produtos é descrita em pormenor nas respetivas instruções de utilização.

- AltoStar® Automation System AM16 Manual IVD do Operador (Hamilton)
- AltoStar® Connect Software Manual IVD (Hamilton)
- Instruções de utilização AltoStar® Purification Kit 1.5
- Instruções de utilização AltoStar® Internal Control 1.5
- Sistemas CFX96™ Dx e CFX96™ Deep Well Dx Manual de operação (Bio-Rad)
- Instruções de utilização FastFinder Standalone (UgenTec NV)

7.1 Volume de amostra

O kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 pode ser utilizado para purificações de ácido nucleico a partir de um volume de amostra de 500 µl quando se utiliza o AltoStar® AM16. É necessário providenciar um volume de amostra adicional para ter em consideração o volume morto do tubo de amostra utilizado (consulte o capítulo 7.2 Tubos de amostra).

7.2 Tubos de amostra

Os tubos de amostra adequados para utilização com o AltoStar® AM16 podem ser adquiridos na Altona Diagnostics (tubo de 7 ml com tampa, 82 x 13 mm, VK000010). Podem ser testados outros tubos de amostra para efeitos de aplicabilidade pelo utilizador. Para mais detalhes, consulte as instruções de utilização do kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

7.3 Códigos de barras da amostra

Para identificação de uma amostra automatizada pelo AltoStar® AM16, todos os tubos de amostra têm de ser etiquetados com um código de barras adequado. Para mais detalhes, consulte as instruções de utilização do kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

7.4 Materiais e dispositivos necessários mas não fornecidos para a AltoStar® Workflow (ordem das tarefas)

O material e os dispositivos apresentados na tabela 2 têm de ser encomendados à Altona Diagnostics.

Tabela 2: Materiais e dispositivos necessários

Material	Descrição	N.º de encomenda
AltoStar® Molecular Diagnostic Workflow	Pacote de produtos contendo o AltoStar® Automation System AM16, o AltoStar® Connect software (versão 1.7.4 ou superior) e equipamentos informáticos	AM16
AltoStar® Detection	Pacote de produtos contendo o CFX96™ Deep Well Dx System com o CFX Manager™ Dx software (versão 3.1), um scanner de código de barras e equipamentos informáticos	DT16
AltoStar® Purification Kit 1.5	Química para o isolamento e purificação de ácidos nucleicos para utilização com o AltoStar® Automation System AM16	PK15-46
AltoStar® Internal Control 1.5	Extração de ácido nucleico e controlo de amplificação e deteção por PCR	IC15-46
AltoStar® Automated Analysis Package	Computador pessoal com software FastFinder Standalone instalado (versão 1.0 ou superior) e pacote de plug-in de ensaio para análise de dados e interpretação automatizada de resultados	VK000045
PCR Plate	Placa multipoços semi-skirted com 96 poços, com código de barras, com poços brancos	VK000005
PCR Plate Sealing Foil	Película de selagem para a placa PCR	VK000006
1,000 µl CO-RE Tips	Pontas com filtros de 1 000 µl para utilização com o AltoStar® Automation System AM16	VK000007

Material	Descrição	N.º de encomenda
300 µl CO-RE Tips	Pontas com filtros de 300 µl para utilização com o AltoStar® Automation System AM16	VK000008
Pooling Tube	Tubo com código de barras para conjugação de reagentes PCR	VK000002
Waste Bag	Saco estéril autoclavável para utilização com o AltoStar® Automation System AM16	VK000009
Screw Cap - red	Tampa de rosca para tubos PC (vermelho)	VK000012
Screw Cap - blue	Tampa de rosca para tubos de Master A (azul)	VK000013
Screw Cap - purple	Tampa de rosca para tubos de Master B (violeta)	VK000015
Screw Cap - white	Tampa de rosca para tubos de NTC (branco)	VK000016

Tabela 3: Materiais e dispositivos de laboratório adicionais

Material	Descrição	N.º de encomenda
Selador de placa	por ex., AltoStar® Plate Sealer	VK000023
	por ex., PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad)	VK000033

7.5 Materiais e dispositivos gerais

- Agitador vortex
- Luvas sem pó (descartáveis)
- Centrifugadora para centrifugação dos componentes do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5
- Centrifugadora para centrifugação de placas PCR

7.6 Procedimento

7.6.1 Perspetiva geral da AltoStar® Workflow (ordem das tarefas)

Os passos da AltoStar® Workflow (ordem das tarefas) completa estão resumidos na tabela 4. São fornecidas informações sobre definições específicas para utilizar com o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 no capítulo 7.6.2 Programar um AltoStar® run (processamento). Para obter instruções detalhadas relativamente aos passos 1–5, consulte as instruções de utilização do kit AltoStar® Purification Kit 1.5, do AltoStar® Connect software e do AltoStar® AM16.

Os passos 6–9 são descritos com mais pormenor do capítulo 7.6.3 Iniciar um processamento de configuração PCR ao capítulo 7.6.6 Iniciar um processamento PCR.

Os passos 10 e 11 diferem consoante a interpretação dos resultados seja manual ou automatizada. Poderá encontrar mais informações sobre a interpretação manual de resultados do capítulo 7.6.7 Análise de dados PCR usando o CFX Manager™ Dx software ao capítulo 7.6.10 Exportação de resultados PCR para interpretação manual de resultados. Os passos da análise de dados e interpretação automatizada de resultados opcional usando o FastFinder são descritos com mais pormenor no capítulo 7.6.11 Análise de dados PCR e interpretação automatizada de resultados usando o FastFinder.

Tabela 4: Perspetiva geral da AltoStar® Workflow (ordem das tarefas)

Passo	Ação
1. Iniciar o AltoStar® AM16	<ul style="list-style-type: none"> • Ligue o AltoStar® AM16. • Ligue o computador e o monitor. • Inicie o AltoStar® Connect software.
2. Efetuar a manutenção	<ul style="list-style-type: none"> • Na barra de menus, clique em Application → Instrument Maintenance (Aplicação → Manutenção de Instrumento). <ul style="list-style-type: none"> ◦ No caso de manutenção semanal, clique em Start Weekly Maintenance (Iniciar Manutenção Semanal). ◦ No caso de manutenção diária, clique em Start Daily Maintenance (Iniciar Manutenção Diária). • Siga as instruções no ecrã relativas ao processo de manutenção.
3. Programar um AltoStar® run (processamento)	<ul style="list-style-type: none"> • Na barra de menus, clique em Program Run → Program Run (AltoStar® Purification) [Processamento de Programa → Processamento de Programa (Purificação AltoStar®)]. Em alternativa, regresse ao ecrã Start (Inicial) e clique no botão Program Run (Processamento de Programa). • Introduza as amostras ou importe-as a partir do LIMS. • Selecione o seguinte ensaio para as amostras, exceto se já tiver sido importado do LIMS: <ul style="list-style-type: none"> ◦ AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 • Clique no botão Create Run (Criar Processamento) na barra de ferramentas para criar o AltoStar® run (processamento).

Passo	Ação
<p>4. Iniciar um processamento de purificação</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Na barra de menus clique em Purification → Start Purification (Purificação → Iniciar Purificação). Em alternativa, regresse ao ecrã Start (Inicial) e clique no botão Start Purification (Iniciar Purificação). • Selecione o processamento de purificação a ser iniciado para apresentar as amostras incluídas no processamento de purificação selecionado. • Prepare os reagentes de purificação: <ul style="list-style-type: none"> ◦ Certifique-se de que os reagentes de purificação a utilizar têm o mesmo número de carga [exceto para o AltoStar® Internal Control 1.5 (controlo interno)] e não estão fora da validade. ◦ Se existirem precipitados visíveis no Lysis Buffer (tampão de lise), aqueça-o ($\leq +50$ °C) até dissolverem totalmente. ◦ Descongele o IC [AltoStar® Internal Control 1.5 (controlo interno)] e agite em vortex durante 5 segundos. ◦ Agite em vortex as Magnetic Beads (esferas magnéticas) durante 5 segundos sem molhar a tampa. • Prepare as amostras para o processamento de purificação a ser iniciado, conforme descrito nas instruções de utilização do kit AltoStar® Purification Kit 1.5. • Clique no botão Start Run (Iniciar Processamento) na barra de ferramentas. • Siga a caixa de diálogo Loading (Carregamento) e carregue o instrumento em conformidade. • Confirme a mensagem Loading complete (Carga Concluída) com OK ou guarde 10 segundos. <p>O sistema realizará automaticamente o processamento de purificação.</p>

Passo	Ação
5. Concluir o processamento de purificação	<ul style="list-style-type: none">• Certifique-se de que o tabuleiro de carga está vazio e confirme a caixa de diálogo Run finished (Processamento Concluído) com OK.• Siga as instruções na caixa de diálogo Maintenance (Manutenção) e confirme com OK.• Sele e armazene os componentes do kit AltoStar® Purification Kit 1.5 que podem ser reutilizados. <p>Os eluatos na placa de eluato não selada mantêm-se estáveis à temperatura ambiente (máx. +30 °C) durante 4 horas.</p> <ul style="list-style-type: none">• Se o processamento de configuração PCR associado não for iniciado de imediato, sele a placa de eluato com uma película de selagem da placa de eluato e armazene entre +2 °C e +8 °C até 24 horas.• Observe os resultados do processamento de purificação para confirmar o processamento com sucesso de cada amostra.

Passo	Ação
6. Iniciar um processamento de configuração PCR	<ul style="list-style-type: none"> • Na barra de menus, clique em PCR Setup → Start PCR Setup (Configuração PCR → Iniciar Configuração PCR). Em alternativa, regresse ao ecrã Start (Inicial) e clique no botão Start PCR Setup (Iniciar Configuração PCR). • Selecione o processamento de configuração PCR a iniciar para visualizar a placa de eluato e os reagentes incluídos no processamento de configuração PCR selecionado. • Prepare os reagentes PCR: <ul style="list-style-type: none"> ◦ Certifique-se de que os reagentes principais e os controlos a usar pertencem ao mesmo lote de kit e estão dentro do prazo de validade. ◦ Descongele a quantidade necessária de tubos de reagente principal e controlo, agite brevemente em vortex e centrifugue numa centrifugadora. • Se a placa de eluato estiver selada, centrifugue-a brevemente e remova a selagem com cuidado. • Clique no botão Start Run (Iniciar Processamento) na barra de ferramentas. • Siga a caixa de diálogo Loading (Carregamento) e carregue no respetivo instrumento. • Confirme a mensagem Loading complete (Carga Concluída) com OK ou aguarde 10 segundos. <p>O sistema realizará automaticamente o processamento de configuração PCR.</p>
7. Concluir o processamento de configuração PCR	<ul style="list-style-type: none"> • Certifique-se de que o tabuleiro de carga está vazio e confirme a caixa de diálogo Run finished (Processamento Concluído) com OK. • Siga as instruções na caixa de diálogo Maintenance (Manutenção) e confirme com OK. • Feche e armazene os componentes do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 que podem ser reutilizados. • Observe os resultados de processamento de configuração PCR para confirmar o processamento com sucesso de cada amostra.
8. Selar a placa PCR	<ul style="list-style-type: none"> • Sele a placa PCR com uma película de selagem para placa PCR.

Passo	Ação
9. Iniciar o processamento PCR	<ul style="list-style-type: none">• Ligue o CFX96™ DW Dx e o respetivo computador e monitor.• Inicie o CFX Manager™ Dx software.• Abra o CFX96™ DW Dx.• Centrifugue a placa PCR e insira-a no CFX96™ DW Dx.• Selecione File → Open → LIMS File... (Ficheiro → Abrir → Ficheiro LIMS...) a partir da barra de menus.• Leia o código de barras da placa PCR com o scanner de código de barras portátil.• Feche o CFX96™ DW Dx.• Clique no botão Start Run (Iniciar Processamento) para iniciar o processamento PCR. Atribua um nome e guarde o ficheiro do processamento PCR. <p>O CFX96™ DW Dx realizará automaticamente o processamento PCR.</p>

Passo	Ação	
Passo	Ação para análise de dados e geração de relatórios com o CFX Manager™ Dx software para posterior interpretação manual de resultados ou interpretação de resultados por LIMS	Ação para análise de dados e interpretação automatizada de resultados opcional utilizando o FastFinder
10. Separar ensaios para análise individual	<ul style="list-style-type: none"> • Separe todos os ensaios no processamento PCR em grupos de poços distintos. 	Não necessário.
11. Analisar os dados e interpretar os resultados do processamento PCR	<p>Para cada grupo de poços individualmente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Efetue a correção da linha de base em todos os poços para todos os canais de detecção utilizados. • Exclua os poços com sinais irregulares de PCR. • Defina os limiares de todos os canais de detecção de acordo com os controles. • Exclua os poços que contêm dados inválidos. • Crie o ficheiro de resultados LIMS para a exportação de resultados para o LIMS. • Crie o relatório de resultados para a interpretação manual de resultados. 	<ul style="list-style-type: none"> • Utilize o FastFinder Standalone e o plug-in de ensaio do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 para análise de dados e interpretação automatizada de resultados.

ATENÇÃO



O armazenamento de eluatos nas condições erradas poderá provocar a degradação da sequência-alvo do HAV, o que poderia comprometer o desempenho do produto.

7.6.2 Programar um AltoStar® run (processamento)

Para obter informações detalhadas sobre como iniciar um AltoStar® run (processamento), consulte as instruções de utilização do kit AltoStar® Purification Kit 1.5, do AltoStar® Connect software e do AltoStar® AM16. As definições específicas para utilização com o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 são indicadas abaixo:

- São selecionados PC e NTC.
- O volume de amostra necessário é de 500 µl, acrescido do volume morto, para o respetivo tubo de amostra (consulte os capítulos 7.1 Volume de amostra e 7.2 Tubos de amostra).
- O volume de eluato necessário para o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 é de 10 µl.
- Certifique-se de que a versão correta do protocolo de ensaio é utilizada para o processamento. Para informações sobre a versão do protocolo atual, consulte o capítulo 17. Protocolo de ensaio para o AltoStar® Connect software e informação para a integração LIMS. O respetivo protocolo de ensaio está codificado no código de barras 2D aí apresentado. Para informações sobre purificação e importação do protocolo de ensaio para o AltoStar® Connect software, consulte as respetivas instruções de utilização.

ATENÇÃO



Não utilize uma versão do protocolo de ensaio que não seja a indicada no código de barras 2D nestas instruções de utilização. A utilização de uma versão incorreta do protocolo de ensaio poderia comprometer o desempenho do produto.

7.6.3 Iniciar um processamento de configuração PCR

1. Selecione **PCR Setup** → **Start PCR Setup** (Configuração PCR → Iniciar Configuração PCR) na barra de menus. Em alternativa, regresse ao Ecrã Inicial do AltoStar® Connect software e selecione o botão **Start PCR Setup** (Iniciar Configuração PCR). É apresentado o ecrã Start PCR Setup Run (Iniciar Processamento de Configuração PCR).

Os processamentos de configuração PCR pendentes são apresentados na tabela Programmed PCR Setup Runs (Processamentos de Configuração PCR Programados) no lado esquerdo do ecrã.

2. Selecione o processamento de configuração PCR a iniciar na tabela Programmed PCR Setup Runs (Processamentos de Configuração PCR Programados).
 - As amostras incluídas no processamento de configuração PCR selecionado são apresentadas na tabela no lado superior direito do ecrã [Samples in selected PCR Setup Run (Amostras no Processamento de Configuração PCR selecionado)].
 - Os controlos necessários para o processamento de configuração PCR selecionado são apresentados na tabela no lado direito central do ecrã [Controls in selected PCR Setup Run (Controlos no Processamento de Configuração PCR selecionado)].
 - O número de tubos principais necessário para o processamento de configuração PCR selecionado é apresentado na tabela no lado inferior direito do ecrã [Required master tubes for the selected PCR Setup Run (Tubos principais necessários para o Processamento de Configuração PCR selecionado)].

NOTA



O número de amostras prioritárias num processamento de configuração PCR é apresentado na coluna **No. of prioritized Samples** (N.º de Amostras prioritárias). Realize os processamentos de configuração PCR com amostras prioritárias em primeiro lugar para permitir o processamento mais rápido dessas amostras.

Antes de clicar no botão **Start Run** (Iniciar Processamento) na barra de ferramentas, prepare os reagentes necessários, conforme descrito no capítulo 7.6.3.1 Preparação de reagentes para um processamento de configuração PCR. Se a placa de eluato necessária para o processamento de configuração PCR selecionado tiver sido selada para efeitos de armazenamento, prepare-a conforme descrito nas instruções de utilização do kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

7.6.3.1 Preparação de reagentes para um processamento de configuração PCR

1. Descongele totalmente os controlos e o número necessário de tubos principais à temperatura ambiente (máx. +30 °C).
2. Misture os reagentes por agitação ligeira em vortex.
3. Centrifugue brevemente os tubos para remover as gotas da tampa.

ATENÇÃO



A falta de centrifugação dos componentes do produto após a descongelação poderá provocar contaminação com resíduos de reagentes nas tampas, o que poderia comprometer o desempenho do produto.

7.6.3.2 Carregar o AltoStar® AM16 para um processamento de configuração PCR

Para informações pormenorizadas relativas ao processo de carga, consulte as instruções de utilização do AltoStar® AM16 e do AltoStar® Connect software.

1. Clique no botão **Start Run** (Iniciar Processamento) na barra de ferramentas do ecrã Start PCR Setup Run (Iniciar Processamento de Configuração PCR) para visualizar a caixa de diálogo Loading (Carregamento).

A caixa de diálogo Loading (Carregamento) consiste numa representação visual da plataforma AltoStar® AM16 no topo e numa tabela especificando os transportes, as respetivas calhas na plataforma AltoStar® AM16 para cada transporte, o material a carregar em cada transporte e os comentários relativos à carga do transporte.

NOTA

Para visualizar a posição de um item num transporte e a posição do transporte na plataforma AltoStar® AM16, selecione a respetiva linha da tabela na caixa de diálogo Loading (Carregamento).



É visualizada a posição do item e respetivo transporte:

- Realçado a vermelho na representação visual da plataforma de instrumentos
- No AltoStar® AM16 através de luzes de carga intermitentes acima das calhas onde o transporte selecionado tem de ser colocado

2. Carregue o material necessário, a placa de eluato preparada e os reagentes preparados nos transportes adequados.
 - Troque apenas bastidores de pontas de 1 000 µl **completamente vazios** por bastidores de pontas de 1 000 µl **completamente cheios** no transporte de pontas.
 - Troque apenas bastidores de pontas de 300 µl **completamente vazios** por bastidores de pontas de 300 µl **completamente cheios** no transporte de pontas e placas.

NOTA

A troca de bastidores de pontas que não estejam completamente vazios, assim como o manuseio de pontas individuais, poderão interferir com a gestão automática das pontas e provocar a interrupção do processamento.

- Coloque a placa de eluato necessária com o poço A1 à esquerda da posição da placa preta.
- Coloque uma placa PCR com o poço A1 à esquerda da posição da placa frontal prateada.
- Carregue um transporte do tubo 24 com um tubo de conjugação não utilizado para cada ensaio no processamento de configuração PCR.
- Empurre com cuidado os tubos totalmente até ao fundo do transporte e rode-os até que os códigos de barras do tubo fiquem visíveis na janela do transporte.
- Carregue o transporte de tubo de reagente 32 com os componentes do ensaio necessários para o processamento de configuração PCR.

- Empurre com cuidado os tubos totalmente até ao fundo do transporte e rode-os até que os códigos de barras do tubo fiquem visíveis na janela do transporte.

NOTA



A posição dos tubos individuais nos transportes é arbitrária.

NOTA



O volume dos componentes carregados não é verificado pelo sistema antes do processamento. Um volume de componente insuficiente impedirá uma configuração PCR bem-sucedida relativamente ao ensaio em questão.

NOTA



Iniciar um processamento de configuração PCR com as tampas nos tubos pode provocar a interrupção do processamento durante o processamento.

3. Carregue os transportes com o código de barras do transporte direcionado para a retaguarda virado para a direita.
4. Introduza os transportes preenchidos nas respetivas calhas, entre os blocos deslizantes da parte frontal e traseira do tabuleiro de carga, até que estes toquem nos ganchos de paragem no lado mais afastado do tabuleiro de carga.

NOTA



Empurrar os transportes para além dos ganchos de paragem pode danificar o instrumento e interferir com o processo de carga.

5. Verifique se a chapa de ejeção de pontas e o recipiente de eliminação de pontas estão na posição correta e se foi colocado um novo saco de resíduos no recipiente.
6. Clique em **OK** na caixa de diálogo Loading (Carregamento) para avançar com o processo de carga.

NOTA



Clicando em **Cancel** (Cancelar), o processamento de configuração PCR será cancelado, mas pode ser iniciado novamente (consulte o capítulo 7.6.3 Iniciar um processamento de configuração PCR).

O AltoStar® AM16 coloca os transportes no instrumento e efetua a verificação do código de barras.

NOTA



O AltoStar® AM16 verifica automaticamente:

- O tipo e a localização corretos dos transportes carregados
- A identidade e a posição corretas dos itens carregados nos transportes
- A congruência do lote dos componentes dos kits de ensaio individuais AltoStar®
- A validade de todos os componentes do ensaio AltoStar® carregados
- O posicionamento correto da chapa de ejeção de pontas

Se alguma destas verificações falhar, é apresentada uma caixa de diálogo de mensagem especificando o problema em questão e as instruções para corrigir o problema em conformidade. Para mais informações relativas ao tratamento de erros, consulte as instruções de utilização do AltoStar® Connect software.

NOTA



Alterar as posições de qualquer item carregado depois de o transporte ter sido colocado no instrumento pode dar origem ao cancelamento do processamento de configuração PCR e/ou danificar o instrumento.

Quando todas as verificações forem aprovadas é apresentada a caixa de diálogo Loading complete (Carga Concluída).

7. Confirme a caixa de diálogo Loading complete (Carga Concluída) clicando em **OK** ou aguarde 10 segundos para o início automático do processo.

NOTA

Clicando em **Cancel** (Cancelar), o processamento de configuração PCR será cancelado, mas pode ser iniciado novamente (consulte o capítulo 7.6.3 Iniciar um processamento de configuração PCR).

O processamento de configuração PCR é iniciado e será conduzido sem a intervenção de utilizador.

7.6.3.3 Durante o processamento de configuração PCR

Não é necessária a interação de utilizador até à conclusão do processamento de configuração PCR. O ecrã de Processing Status (Estado de Processamento) é apresentado mostrando o estado do processamento de configuração PCR e o tempo estimado restante.

NOTA

Empurrar ou puxar os transportes ou a porta do AltoStar® AM16 durante um processamento de configuração PCR poderá cancelar o processamento.

7.6.4 Conclusão do processamento de configuração PCR

No final do processamento de configuração PCR, é apresentada a caixa de diálogo Run finished (Processamento Concluído).

1. Certifique-se de que o tabuleiro de carga está vazio.
2. Confirme a caixa de diálogo Run finished (Processamento Concluído) clicando em **OK**.

O AltoStar® AM16 descarregará os transportes. Certifique-se de que não fica em frente aos transportes a descarregar.

Depois de descarregar é apresentada a caixa de diálogo Maintenance (Manutenção).

3. Siga as instruções da caixa de diálogo Maintenance (Manutenção).

A tabela da caixa de diálogo apresenta o número de reações nos tubos principais que não foram utilizados no processamento de configuração PCR.

4. Se for imediatamente iniciado um outro processamento de configuração PCR que utiliza a placa de eluato atualmente carregada, a placa de eluato pode manter-se não selada na posição do transporte. Se **não** for o caso, sele e armazene a placa de eluato. Para mais informações, consulte as instruções de utilização do kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

NOTA



Após a conclusão do processamento de purificação, os eluatos na placa de eluato mantêm-se estáveis à temperatura ambiente (máx. +30 °C) durante um total de 4 horas.

5. Feche os tubos de reagente com tampas novas apropriadas.

ATENÇÃO



Não reutilize tampas de tubos para evitar a contaminação dos reagentes, pois tal poderia comprometer o desempenho do produto.

6. Armazene os reagentes para reutilização conforme descrito no capítulo 4.2 Manuseamento.
7. Elimine os materiais usados (consulte o capítulo 10. Eliminação).
8. Confirme a caixa de diálogo Maintenance (Manutenção) clicando em **OK**.

7.6.4.1 Resultados do processamento de configuração PCR

Os resultados do processamento de configuração PCR são guardados no AltoStar® Connect software.

1. Clique em **PCR Setup** → **PCR Setup Results** (Configuração PCR → Resultados de Configuração PCR) na barra de menus para aceder ao ecrã de Results (Resultados).

O ecrã de Results (Resultados) apresenta uma tabela com todas as amostras utilizadas no mais recente processamento de configuração PCR e uma coluna **Status** (Estado) à direita que indica se o processo de configuração PCR de uma determinada amostra ficou totalmente concluído (consulte a tabela 5).

Tabela 5: Resultados do processamento de configuração PCR

Status (Estado)	Resultado do processamento de configuração PCR
Processed (Processado)	<ul style="list-style-type: none"> O eluato foi processado com sucesso no processamento de configuração PCR. A mistura RT-PCR resultante está pronta para ser utilizada num processamento PCR.
Error (Erro)	<ul style="list-style-type: none"> O eluato não foi processado com sucesso. A respetiva mistura RT-PCR será automaticamente omitida na análise PCR seguinte.

- Para visualizar os resultados de processamentos de configuração PCR anteriores, clique no botão **Load** (Carregar) na barra de menus, selecione o processamento de configuração PCR pretendido a partir da lista na caixa de diálogo de abertura Load Results (Carregar Resultados) e clique em **OK**.

São automaticamente gerados 3 ficheiros de resultado de processamento de configuração PCR pelo AltoStar® Connect software:

- Um ficheiro LIMS (.xml) para passar informações detalhadas sobre o processamento de configuração PCR, incluindo resultados, para o LIMS
- Um relatório (.pdf) com informações detalhadas sobre o processamento de configuração PCR, incluindo resultados, para efeitos de documentação
- Um ficheiro ciclador (.plrn) para a programação automática do CFX96™ DW Dx

Estes ficheiros estão guardados no local especificado nas definições do sistema do AltoStar® Connect software.

NOTA

Os ficheiros de resultado de processamento de configuração PCR podem ser novamente gerados carregando o respetivo processamento de configuração PCR e clicando no botão **Create LIMS File** (Criar Ficheiro LIMS), para gerar o ficheiro LIMS, ou no botão **Create Report** (Criar Relatório), para gerar o relatório, ou no botão **Create Bio-Rad Cyclor File** (Criar Ficheiro Ciclador Bio-Rad) para gerar o ficheiro ciclador.

7.6.5 Selagem da placa PCR

Após a conclusão do processamento de configuração PCR, a placa PCR tem de ser selada com uma película de selagem para placa PCR. Recomenda-se a utilização do AltoStar® Plate Sealer (selador de placa) [4s3™ Semi-Automatic Sheet Heat Sealer (4titude)] ou do PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad). A adequabilidade de seladores de placa diferentes dos recomendados tem de ser avaliada pelo utilizador.

Se um dos seladores de placa recomendados for utilizado para selagem, siga os seguintes passos:

1. Ligue o selador de placa e certifique-se de que o adaptador de placa não está na gaveta.
2. Certifique-se de que as definições do selador de placa são as seguintes:

Tabela 6: Definições do selador de placa

Selador de placa	Definições	
	Temperatura [°C]	Tempo [s]
AltoStar® Plate Sealer [4s3™ Semi-Automatic Sheet Heat Sealer (4titude)]	170	2
PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad)	175	3

3. Aguarde até ser atingida a temperatura definida. Esta operação pode demorar vários minutos.
4. Coloque a placa PCR no adaptador de placa do selador de placa.
5. Coloque uma película de selagem para placa PCR na placa PCR de forma a que o texto impresso «THIS SIDE UP» (este lado para cima) fique legível. Certifique-se de que todos os poços da placa PCR estão cobertos com película e que nenhum poço é ocultado pelo texto escrito.

NOTA



Operar o selador de placa sem o adaptador de placa colocado na gaveta poderá danificar o selador. Neste caso, contacte o apoio técnico da alta Diagnostics para obter assistência (consulte o capítulo 12. Apoio técnico).

NOTA



Se a estrutura ou a película de selagem para placa PCR estiver incorretamente colocada, a película pode aderir à placa de aquecimento no selador de placa durante a selagem. Tal danificará o selador. Neste caso, ou se o passo de selagem tiver sido iniciado sem uma película de selagem para placa PCR, deixe o selador de placa arrefecer até atingir a temperatura ambiente e contacte o apoio técnico da alta Diagnostics para obter assistência (consulte o capítulo 12. Apoio técnico).

6. Monte a estrutura de selagem no topo para prender a película de selagem.
7. Abra a gaveta pressionando o botão **Operate** (Operar)*/ **.
8. Coloque o conjunto constituído pelo adaptador de placa, a placa PCR, a película de selagem para placa PCR e a estrutura de selagem no selador de placa e pressione o botão **Operate** (Operar)*/ **.
9. A gaveta fecha automaticamente, sela durante o tempo definido e reabre automaticamente.
10. Retire a placa PCR selada e o adaptador de placa do selador de placa, e feche o selador de placa pressionando o botão **Close** (Fechar)*/ **.

* AltoStar® Plate Sealer (selador de placa) [4s3™ Semi-Automatic Sheet Heat Sealer (4titude)]

**PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad)

7.6.5.1 Estabilidade da mistura PCR

Após a conclusão do processamento de configuração PCR, a mistura RT-PCR na placa PCR selada mantém-se estável à temperatura ambiente (máx. +30 °C) durante 30 minutos.

ATENÇÃO



Não exceda o tempo de armazenamento da mistura PCR, pois tal poderia comprometer o desempenho do produto.

7.6.6 Iniciar um processamento PCR

O processamento PCR é efetuado num CFX96™ DW Dx sob o controlo do CFX Manager™ Dx software.

1. Ligue o CFX96™ DW Dx e o respetivo computador e monitor.
2. Inicie o CFX Manager™ Dx software.
3. Na barra de menus do CFX Manager™ Dx software, selecione **File** → **Open** → **LIMS File...** (Ficheiro → Abrir → Ficheiro LIMS...) para abrir a caixa de diálogo Open LIMS File (Abrir Ficheiro LIMS).
4. Ao abrir a caixa de diálogo Open LIMS File (Abrir Ficheiro LIMS), certifique-se de que o cursor está a piscar no campo **File name** (Nome do ficheiro) na parte inferior. Caso contrário, clique no campo **File name** (Nome do ficheiro).
5. Digitalize o código de barras da placa PCR com o scanner de código de barras portátil para selecionar e abrir automaticamente o ficheiro LIMS correto. É apresentada a caixa de diálogo Run Setup (Configuração do Processamento).

NOTA



Todos os parâmetros necessários para iniciar o processamento PCR são automaticamente transferidos do AltoStar® Connect software para o CFX96™ DW Dx através do ficheiro ciclador.

6. Clique no botão **Open Lid** (Abrir Tampa) na caixa de diálogo Run Setup (Configuração do Processamento) para abrir a tampa do CFX96™ DW Dx.

7. Centrifugue brevemente a placa PCR selada para garantir que todo o líquido está no fundo dos poços.
8. Insira a placa PCR selada no bloco de aquecimento do CFX96™ DW Dx com o poço A1 para o lado esquerdo.
9. Feche o CFX96™ DW Dx clicando no botão **Close Lid** (Fechar Tampa) na caixa de diálogo Run Setup (Configuração do Processamento).
10. Inicie o processamento PCR clicando no botão **Start Run** (Iniciar Processamento) na caixa de diálogo Run Setup (Configuração do Processamento).

7.6.6.1 Durante o processamento PCR

Não é necessária a interação de utilizador até à conclusão do processamento PCR. A caixa de diálogo Run Details (Detalhes do Processamento) é apresentada mostrando o estado do processamento PCR e o tempo estimado restante.

NOTA



Se abrir a tampa do CFX96™ DW Dx durante um processamento PCR acionando o botão na frente da tampa ou clicando em **Open Lid** (Abrir Tampa) na caixa de diálogo Run Details (Detalhes do Processamento), o processamento será interrompido e todos os resultados serão anulados.

No final do processamento PCR é apresentada a janela Data Analysis (Análise de Dados), que mostra as curvas de amplificação, a disposição da placa e os resultados.

7.6.7 Análise de dados PCR utilizando o CFX Manager™ Dx software

Os resultados de todos os ensaios (grupos de poços) na placa PCR têm de ser analisados de acordo com a sequência ilustrada na figura 1.

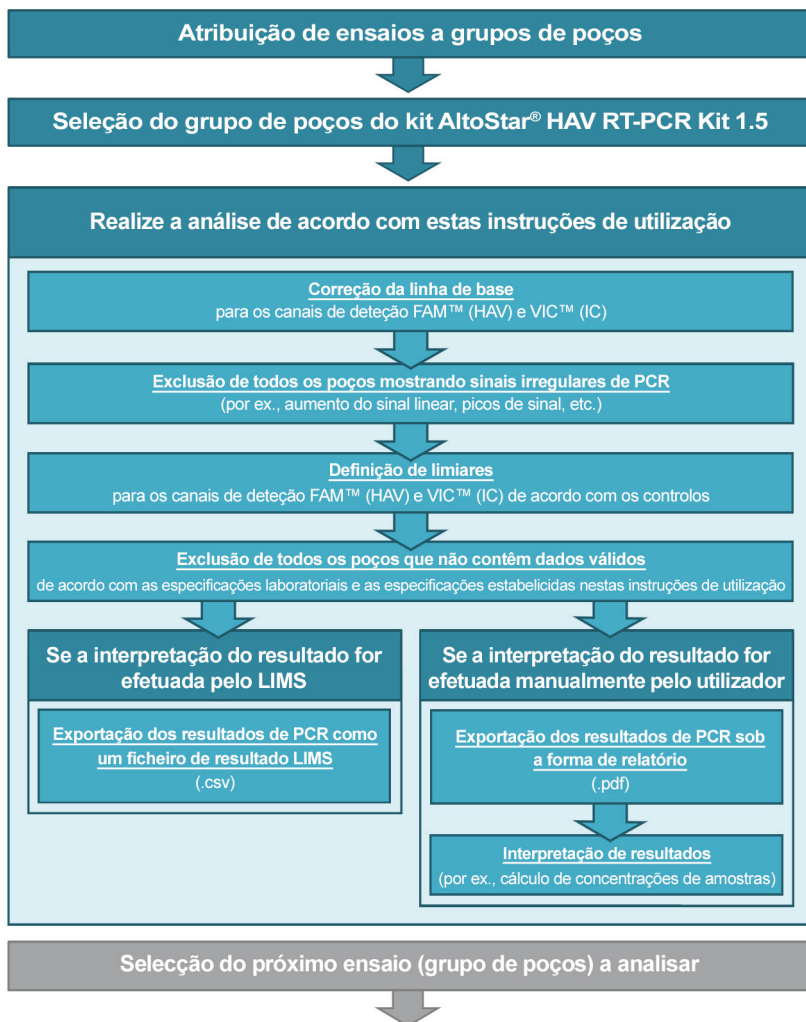


Figura 1: Processo de análise de dados PCR utilizando o CFX Manager™ Dx software

7.6.7.1 Atribuição de ensaios a grupos de poços

A AltoStar® Workflow (ordem das tarefas) processa um ou vários ensaios PCR simultaneamente numa única placa PCR. Contudo, cada ensaio tem de ser analisado em separado pelo utilizador, de acordo com as instruções de utilização do respetivo ensaio.

Para este efeito, todos os ensaios numa placa PCR têm de ser atribuídos a grupos de poços individuais no CFX Manager™ Dx software pelo utilizador.

1. Na janela Data Analysis (Análise de Dados), clique no botão **Plate Setup** (Configuração da Placa) na barra de ferramentas e selecione **View/Edit Plate** (Ver/Editar Placa). É apresentada a caixa de diálogo Plate Editor (Editor de Placas) (consulte a figura 2).

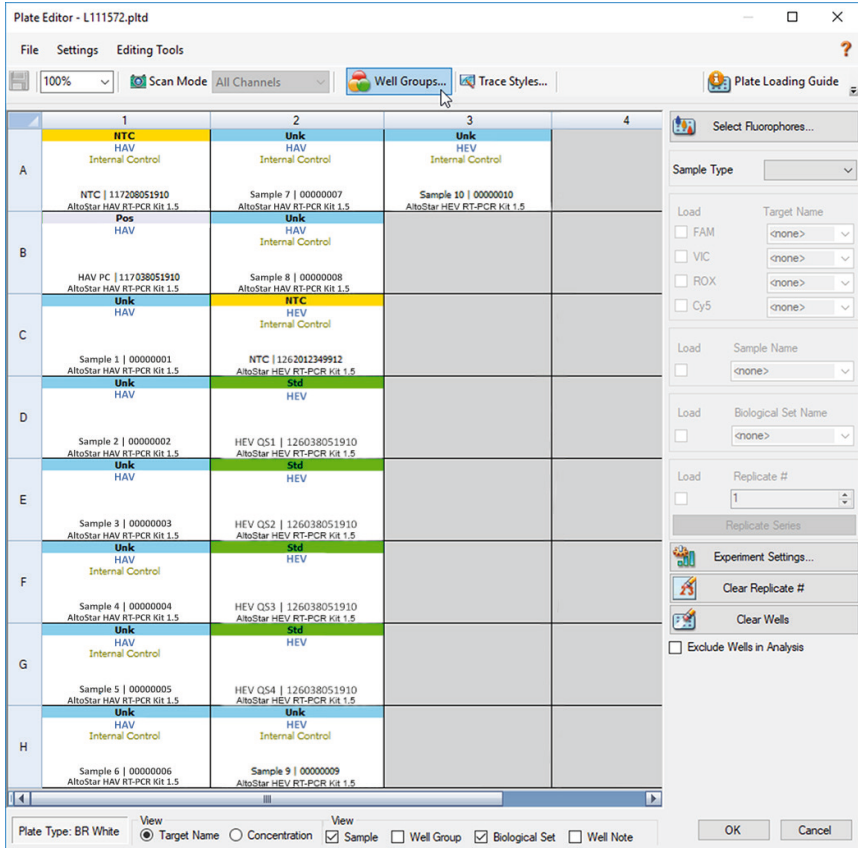


Figura 2: Caixa de diálogo Plate Editor (Editor de Placas)

2. Na caixa de diálogo Plate Editor (Editor de Placas), clique em **Well Groups...** (Grupos de Poços...) na barra de ferramentas. É apresentada a caixa de diálogo Well Groups Manager (Gestor de Grupos de Poços) (consulte a figura 3).
3. Clique no botão **Add** (Adicionar).
4. Digite o nome do primeiro ensaio na caixa de texto.

5. Selecione todos os poços na área da placa PCR que pertencem ao primeiro ensaio (consulte a figura 3). Os poços que pertencem a um ensaio individual podem ser identificados na caixa de diálogo Plate Editor (Editor de Placas) através da entrada no campo **Biological Set** (Conjunto Biológico).

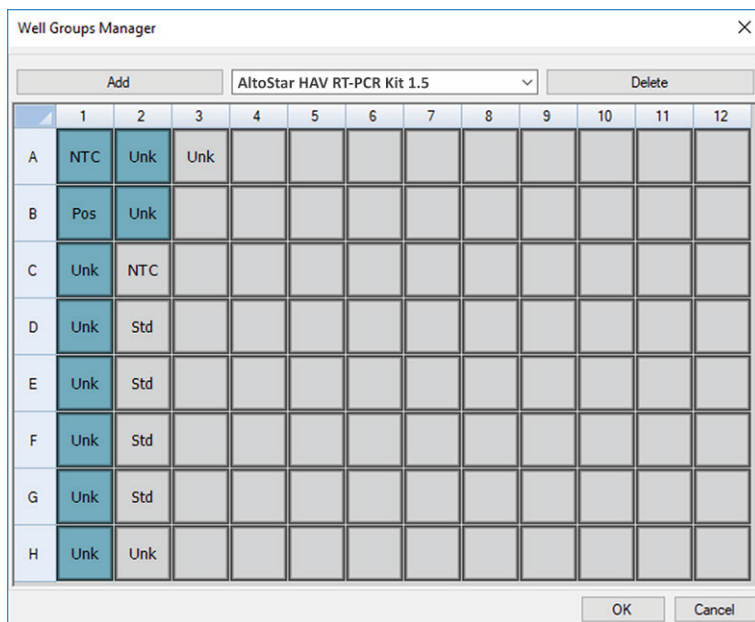


Figura 3: Caixa de diálogo Well Groups Manager (Gestor de Grupos de Poços)

6. Repita os passos 3–5 para todos os ensaios na placa PCR.
7. Confirme a atribuição do grupo de poços clicando em **OK**. A caixa de diálogo Well Groups Manager (Gestor de Grupos de Poços) fecha-se.
8. Feche a caixa de diálogo Plate Editor (Editor de Placas) clicando em **OK**.
9. Confirme para aplicar as alterações clicando em **Yes** (Sim).

Na janela Data Analysis (Análise de Dados), certifique-se de que seleciona o **Well Group** (Grupo de Poços) do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5. Deste modo, clique no menu pendente **Well Group** (Grupo de Poços) junto do botão **Well Group** (Grupo de Poços) (consulte a figura 4) da barra de ferramentas. Não utilize o **Well Group** (Grupo de Poços) «All Wells» (Todos os Poços). A seleção na figura 4 é utilizada como uma vista geral de exemplo.

Antes de analisar os resultados, certifique-se de que os grupo do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 contém todos os poços do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 e não contém poços de outros ensaios.

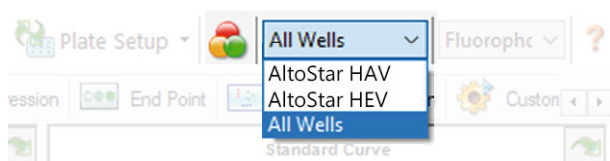


Figura 4: Botão Well Group (Grupo de Poços) e menu pendente Well Group (Grupo de Poços)

NOTA



A análise combinada de mais de um ensaio poderá conduzir a resultados incorretos.

ATENÇÃO



À semelhança de qualquer outro teste de diagnóstico, os resultados devem ser interpretados tendo em consideração todos os dados clínicos e laboratoriais.

7.6.7.2 Correção da linha de base

As definições da linha de base utilizadas pelo CFX Manager™ Dx software podem ter de ser corrigidas para poços individuais do ensaio [**Well Group** (Grupo de Poços)] sob análise.

1. Na janela Data Analysis (Análise de Dados), certifique-se de que seleciona o **Well Group** (Grupo de Poços) do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5. Deste modo, clique no menu pendente **Well Group** (Grupo de Poços) junto do botão **Well Group** (Grupo de Poços) (consulte a figura 4) da barra de ferramentas.
2. Do lado esquerdo da janela Data Analysis (Análise de Dados), assinale apenas a caixa de verificação **FAM** para o canal de deteção-alvo do HAV.
3. Na barra de menus da janela Data Analysis (Análise de Dados), clique em **Settings** → **Baseline Threshold...** (Definições → Limiar da Linha de Base...) para abrir a caixa de diálogo Baseline Threshold (Limiar da Linha de Base) (consulte a figura 5).
4. Clique uma vez no símbolo \diamond no cabeçalho da coluna **Baseline End** (Fim da Linha de Base) para ordenar a tabela por valores **Baseline End** (Fim da Linha de Base) ascendentes.
5. Selecione todas as linhas que apresentam um valor **Baseline End** (Fim da Linha de Base) de 1–9 (consulte a figura 5).

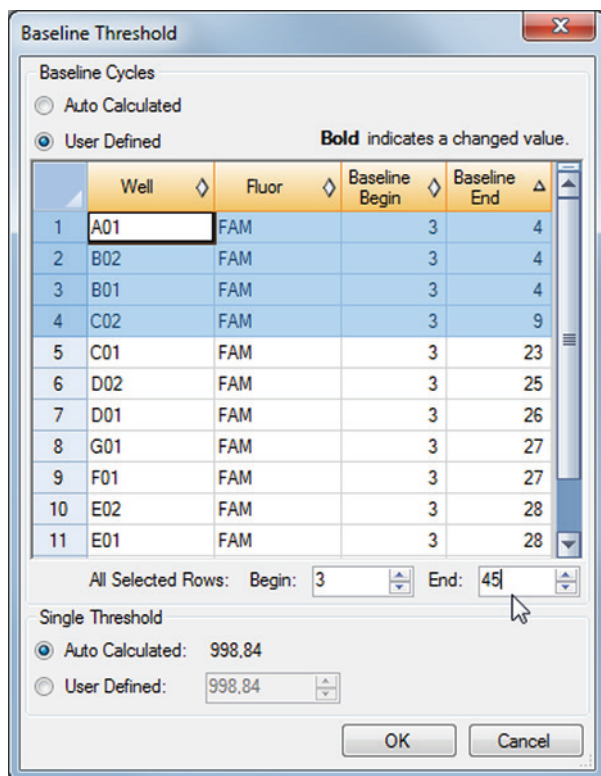


Figura 5: Caixa de diálogo Baseline Threshold (Limiar da Linha de Base)

- Defina o valor no campo **End:** (Fim:) para 45 para as linhas selecionadas (consulte a figura 5).
- Confirme as definições clicando em **OK**.
- Do lado esquerdo da janela Data Analysis (Análise de Dados), anule a seleção da caixa de verificação **FAM** e selecione apenas a caixa de verificação **VIC** para o canal de detecção-alvo de IC.
- Repita os passos 3–7 para o canal de detecção VIC™ (IC).

7.6.7.3 Exclusão de sinais irregulares PCR

Os resultados válidos só podem ser derivados de sinais PCR que não apresentem artefactos nos sinais que poderão ser causados, por ex., por impurezas ou bolhas na mistura RT-PCR. Os sinais PCR que contêm artefactos nos sinais têm de ser excluídos pelo utilizador.

1. Na janela Data Analysis (Análise de Dados), certifique-se de que seleciona o **Well Group** (Grupo de Poços) do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5. Deste modo, clique no menu pendente **Well Group** (Grupo de Poços) junto do botão **Well Group** (Grupo de Poços) (consulte a figura 4) da barra de ferramentas.

- Identifique os poços com sinais PCR irregulares (aumento de sinal linear, picos de sinal, etc.) em qualquer um dos canais de detecção FAM™ (alvo de HAV) e VIC™ (IC) (consulte a figura 6).

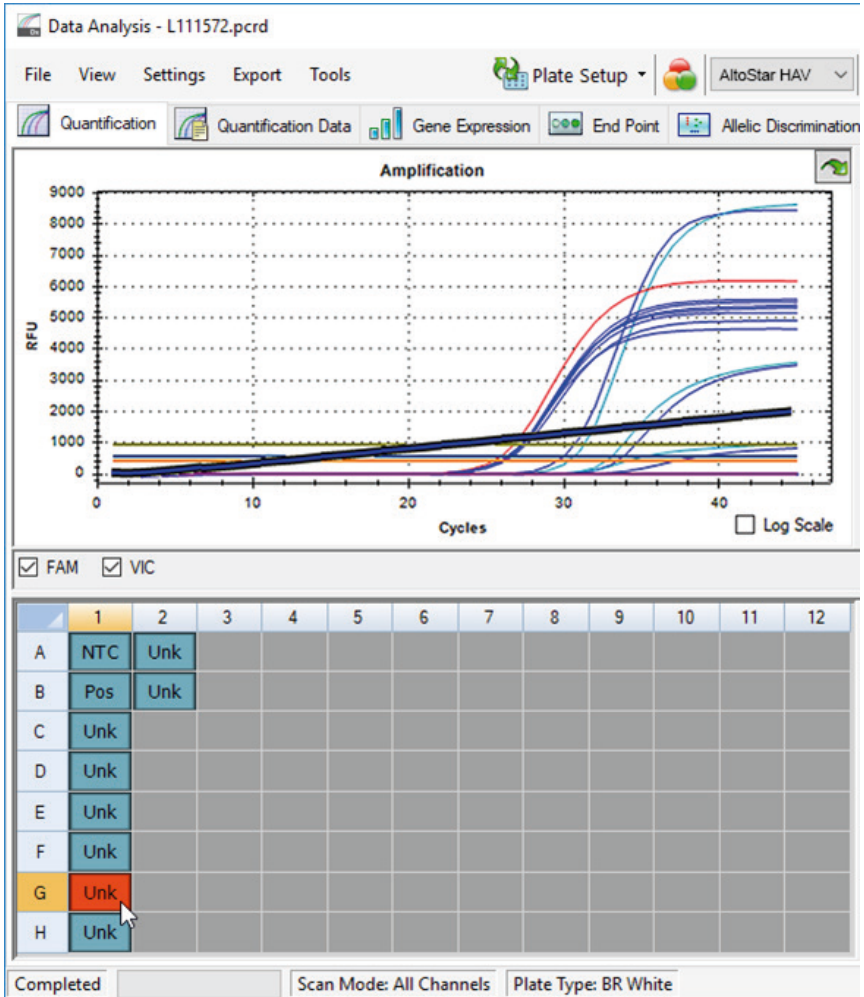


Figura 6: Janela Data Analysis (Análise de Dados): sinal PCR irregular

3. Com o botão direito do rato, clique em cada poço afetado e selecione **Well...** → **Exclude from Analysis** (Poço... → Excluir da Análise) (consulte a figura 7).

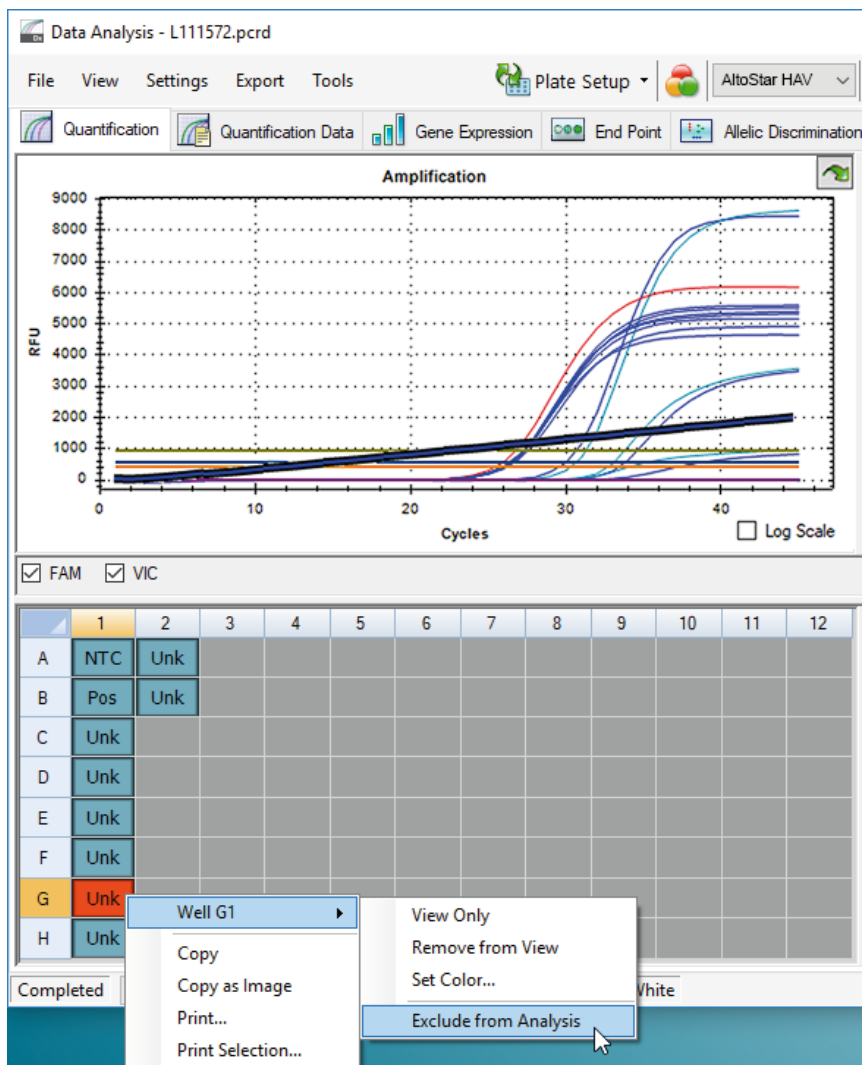


Figura 7: Janela Data Analysis (Análise de Dados): excluir poço da análise

4. O poço selecionado é excluído da análise. Não serão gerados resultados para este poço (consulte a figura 8).

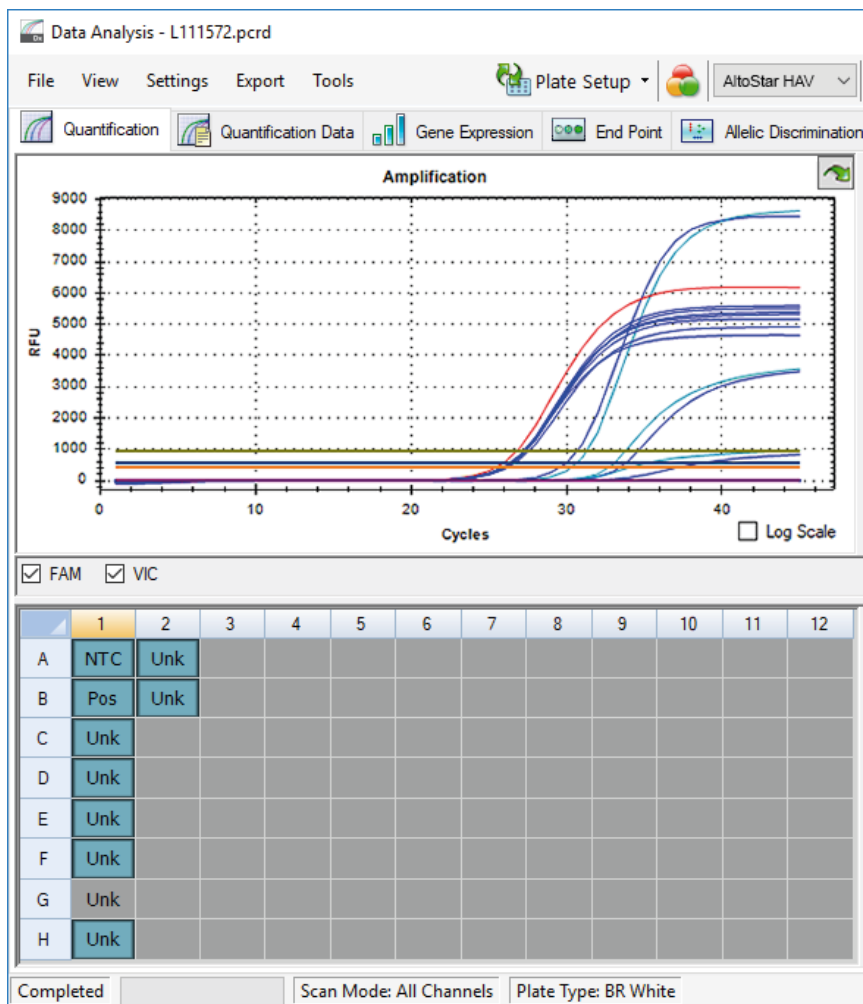


Figura 8: Janela Data Analysis (Análise de Dados): poço excluído

7.6.7.4 Definição de limiares

Os limiares para os canais de detecção FAM™ (alvo de HAV) e VIC™ (IC) têm de ser definidos manualmente pelo utilizador de acordo com os sinais dos controlos.

1. Na janela Data Analysis (Análise de Dados), certifique-se de que seleciona o **Well Group** (Grupo de Poços) do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5. Deste modo, clique no menu pendente **Well Group** (Grupo de Poços) junto do botão **Well Group** (Grupo de Poços) (consulte a figura 4) da barra de ferramentas.

2. Do lado esquerdo da janela Data Analysis (Análise de Dados), assinale apenas a caixa de verificação **VIC** para o canal de detecção do IC (consulte a figura 9).

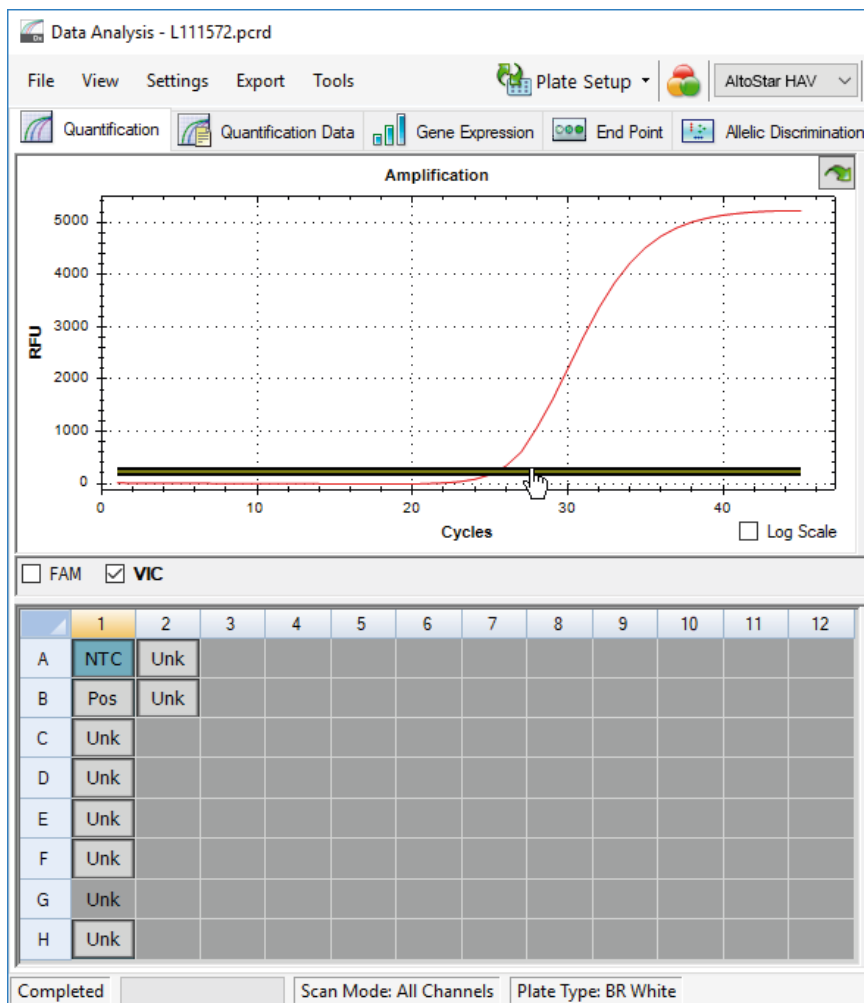


Figura 9: Janela Data Analysis (Análise de Dados): definição do limiar VIC™

3. Selecione apenas o poço NTC na vista da placa da janela Data Analysis (Análise de Dados) (consulte a figura 9).
4. Arraste o limiar para a área exponencial do sinal NTC (consulte a figura 9).

NOTA



O NTC contém o modelo IC, que conduz a um sinal de IC num poço NTC válido.

5. Do lado esquerdo da janela Data Analysis (Análise de Dados), anule a seleção da caixa de verificação **VIC** e assinale a caixa de verificação **FAM** para o canal de deteção do alvo de HAV (consulte a figura 10).

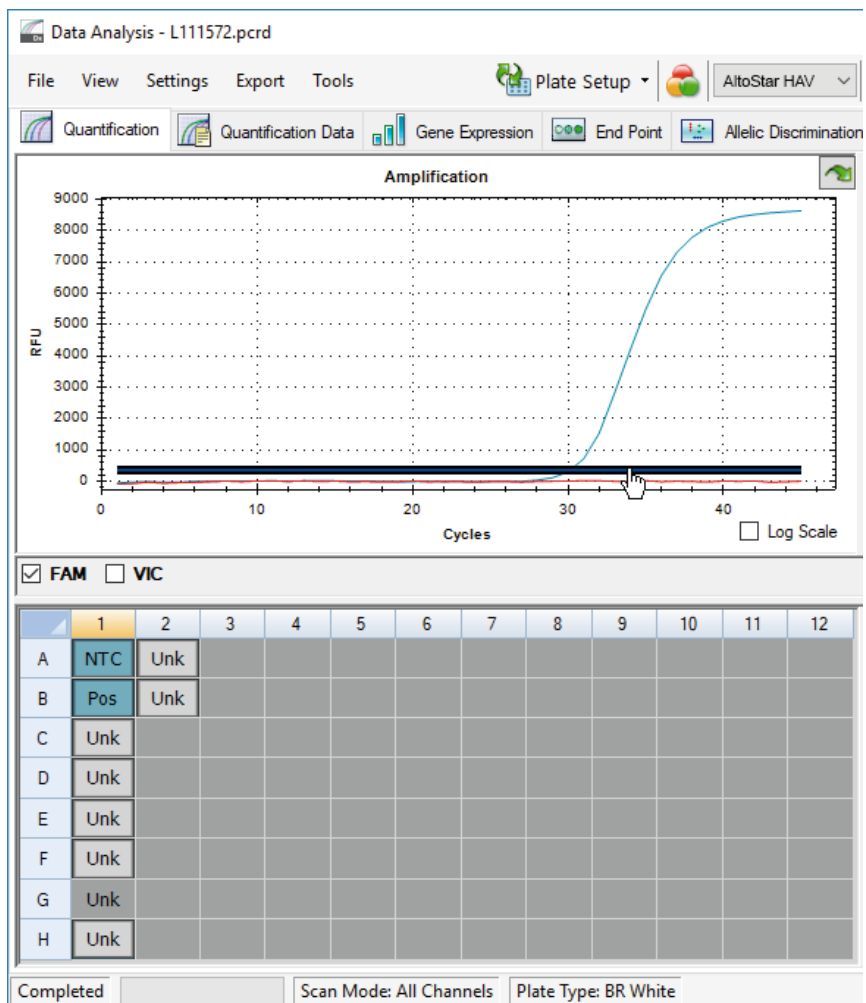


Figura 10: Janela Data Analysis (Análise de Dados): definição do limiar FAM™

6. Selecione apenas os poços que contêm NTC e o PC na vista da placa da janela Data Analysis (Análise de Dados) (consulte a figura 10).
7. Arraste o limiar bem acima do sinal de NTC para a área exponencial do sinal PC (consulte a figura 10).

7.6.8 Validade dos resultados PCR

7.6.8.1 Exclusão de poços com dados inválidos

Os poços que não contêm dados válidos têm de ser excluídos da geração de resultados pelo utilizador.

1. Na janela Data Analysis (Análise de Dados), certifique-se de que seleciona o **Well Group** (Grupo de Poços) do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5. Deste modo, clique no menu pendente **Well Group** (Grupo de Poços) junto do botão **Well Group** (Grupo de Poços) (consulte a figura 4) da barra de ferramentas.
2. Identifique todos os poços que contêm dados inválidos. Um poço é considerado inválido caso se aplique qualquer uma das seguintes condições:
 - a) O processamento completo é inválido (consulte o capítulo 7.6.8.2 Validade de um processamento PCR de diagnóstico).
 - b) Os dados do poço não cumprem as condições de controlo para um resultado válido (consulte o capítulo 7.6.8.3 Validade dos resultados para uma amostra).

- Com o botão direito do rato, clique em cada poço que contém dados inválidos de acordo com os capítulos 7.6.8.2 Validade de um processamento PCR de diagnóstico a 7.6.8.3 Validade dos resultados para uma amostra e selecione **Well...** → **Exclude from Analysis** (Poço... → Excluir da Análise) (consulte as figuras 11 e 12).

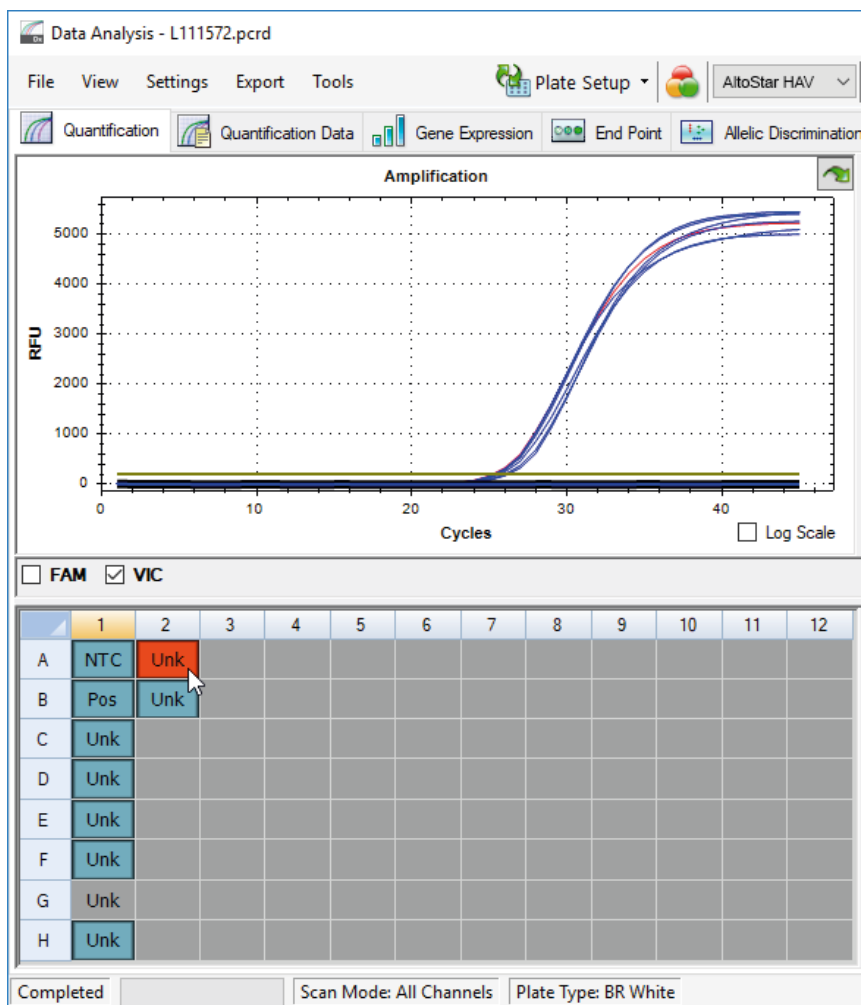


Figura 11: Janela Data Analysis (Análise de Dados): poço inválido

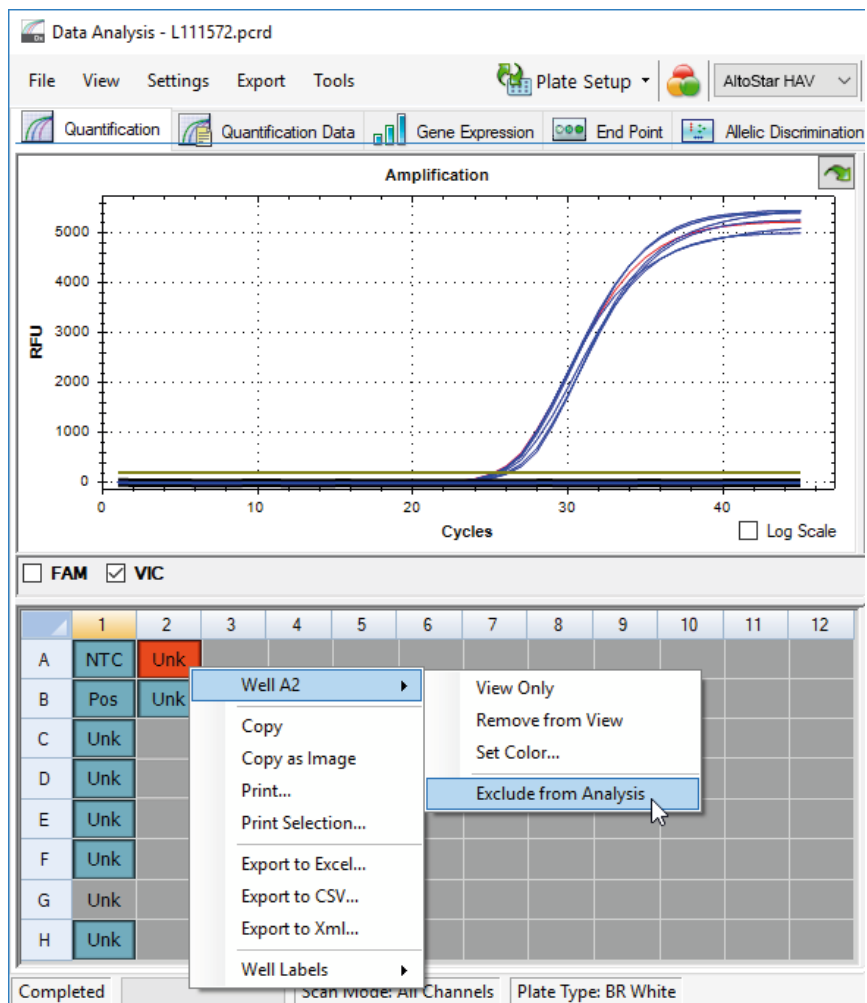


Figura 12: Janela Data Analysis (Análise de Dados): excluir poço inválido da análise

O poço selecionado é excluído da análise. Não serão gerados resultados para este poço.

7.6.8.2 Validade de um processamento PCR de diagnóstico

Um processamento PCR de diagnóstico é considerado **válido** se as seguintes condições de controlo forem cumpridas:

Tabela 7: Condições de controlo para um processamento PCR válido

Controlo	Canal de deteção	
	FAM™ (alvo de HAV)	VIC™ (IC)
PC	+	Não aplicável
NTC	-	+

Um processamento PCR de diagnóstico é **inválido** se:

- O processamento não tiver sido concluído.
- Qualquer uma das condições de controlo para um processamento PCR de diagnóstico não for cumprida.

No caso de um processamento PCR de diagnóstico inválido, exclua todos os poços da análise e repita o AltoStar® run (processamento) a partir das amostras originais.

7.6.8.3 Validade dos resultados para uma amostra

O resultado para uma amostra individual é **inválido** se os sinais em ambos os canais de deteção VIC™ (IC) e FAM™ (alvo de HAV) forem negativos (consulte a tabela 8). No caso de um resultado inválido para uma amostra, exclua o poço da análise e repita o teste a partir da amostra original ou recolha e teste uma nova amostra.

Tabela 8: Validade do resultado

Canal de detecção		Validade do resultado
FAM™ (alvo de HAV)	VIC™ (IC)	
+	+	Resultado válido
+	-	Resultado válido*
-	+	Resultado válido
-	-	Resultado inválido

* A detecção do IC não é necessária quando o alvo de HAV é detetado. Uma carga elevada de ARN do HAV na amostra pode causar a redução ou ausência do sinal de IC.

7.6.9 Exportação de resultados PCR para a interpretação de resultados executada por LIMS

Para disponibilizar os resultados do processamento PCR para um LIMS para uma interpretação de resultados executada por LIMS, é necessário exportá-los como um ficheiro de resultado LIMS (.csv).

1. Na janela Data Analysis (Análise de Dados), certifique-se de que seleciona o **Well Group** (Grupo de Poços) do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5. Deste modo, clique no menu pendente **Well Group** (Grupo de Poços) junto do botão **Well Group** (Grupo de Poços) (consulte a figura 4) da barra de ferramentas.
2. Certifique-se de que todos os passos do processo de análise (consulte os capítulos 7.6.7.2 Correção da linha de base a 7.6.8.1 Exclusão de poços com dados inválidos) foram concluídos para o grupo de poços do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.
3. Na barra de menus da janela Data Analysis (Análise de Dados), clique em **Export** → **Export All Data Sheets** (Exportar → Exportar Todas as Folhas de Dados) para abrir a caixa de diálogo Browse For Folder (Procurar Pasta).
4. Na caixa de diálogo Browse For Folder (Procurar Pasta), especifique a localização dos ficheiros de resultado LIMS a serem gerados e clique em **OK**.

NOTA

A integração LIMS tem de ser implementada de acordo com as especificações da Altona Diagnostics. Para informações relativas à integração LIMS, consulte o capítulo 17. Protocolo de ensaio para o AltoStar® Connect software e informação para a integração LIMS e/ou contacte o apoio técnico da Altona Diagnostics (consulte o capítulo 12. Apoio técnico).

NOTA

Guardar os resultados de mais de um ensaio (grupo de poços) de um processamento PCR na mesma pasta leva à substituição dos ficheiros de resultado LIMS do primeiro ensaio (grupo de poços) pelos ficheiros de resultado LIMS do segundo ensaio (grupo de poços). Neste caso, os ficheiros de resultado LIMS do primeiro ensaio (grupo de poços) podem ser exportados novamente.

7.6.10 Exportação de resultados PCR para a interpretação manual de resultados

Se os resultados não forem passados para um LIMS para uma interpretação de resultados executada por LIMS, a interpretação de resultados tem de ser realizada manualmente pelo utilizador. Para este efeito, é necessário exportar os resultados de análise de cada ensaio (grupo de poços) sob a forma de um relatório.

1. Na janela Data Analysis (Análise de Dados), certifique-se de que seleciona o **Well Group** (Grupo de Poços) do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5. Deste modo, clique no menu pendente **Well Group** (Grupo de Poços) junto do botão **Well Group** (Grupo de Poços) (consulte a figura 4) da barra de ferramentas.
2. Do lado esquerdo da janela Data Analysis (Análise de Dados), selecione a caixa de verificação **VIC** e a caixa de verificação **FAM**.
3. Certifique-se de que todos os passos do processo de análise (consulte os capítulos 7.6.7.2 Correção da linha de base a 7.6.8.1 Exclusão de poços com dados inválidos) foram concluídos para o grupo de poços do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.
4. Na barra de menus da janela Data Analysis (Análise de Dados) clique em **Tools** → **Reports...** (Ferramentas → Relatórios...) para abrir a caixa de diálogo Report (Relatório).

5. Certifique-se de que pelo menos o seguinte conteúdo é selecionado para a geração de relatório na parte superior esquerda da caixa de diálogo Report (Relatório) (consulte a figura 13):

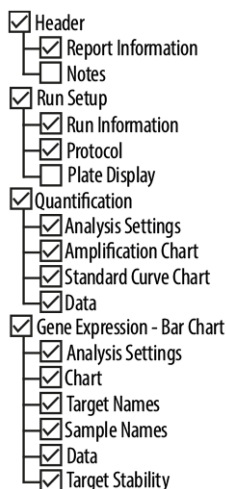


Figura 13: Caixa de diálogo Report (Relatório)

6. Selecione ou anule a seleção de conteúdo adicional do relatório assinalando as respetivas caixas de verificação, conforme necessário.
7. Na barra de menus da caixa de diálogo Report (Relatório), clique em **File** → **Save As...** (Ficheiro → Guardar Como...) para abrir a caixa de diálogo Save Report (Guardar Relatório).
8. Na caixa de diálogo Save Report (Guardar Relatório), especifique o nome e a localização do ficheiro de relatório a ser gerado e clique em **Save** (Guardar).

7.6.10.1 Interpretação manual dos resultados

1. Abra o ficheiro de relatório gerado para o grupo de poços do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5, (consulte o capítulo 7.6.10 Exportação de resultados PCR para a interpretação manual de resultados).
2. Consulte a tabela Quantification Data (Dados de Quantificação) no relatório (consulte a figura 14). A tabela é composta por 2 linhas para cada **Sample** (Amostra) – uma para o **Target** (Alvo) *HAV* e uma para o **Target** (Alvo) *Internal Control* (controlo interno).

Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Biological Set Name	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Well Note
A01	FAM	HAV	NTC	NTC 117201022202	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	
A02	FAM	HAV	Unkn	Sample 7 00000007	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	35.44	35.44	0.000	qualitative
B01	FAM	HAV	Pos Ctrl	HAV PC 117111022206	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	31.37	31.37	0.000	
B02	FAM	HAV	Unkn	Sample 8 00000008	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	35.08	35.08	0.000	qualitative
C01	FAM	HAV	Unkn	Sample 1 00000001	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	36.33	36.33	0.000	qualitative
D01	FAM	HAV	Unkn	Sample 2 00000002	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	36.57	36.57	0.000	qualitative
E01	FAM	HAV	Unkn	Sample 3 00000003	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	34.26	34.26	0.000	qualitative
F01	FAM	HAV	Unkn	Sample 4 00000004	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	35.39	35.39	0.000	qualitative
G01	FAM	HAV	Unkn	Sample 5 00000005	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	35.96	35.96	0.000	qualitative
H01	FAM	HAV	Unkn	Sample 6 00000006	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	34.93	34.93	0.000	qualitative
A01	VIC	Internal Control	NTC	NTC 117201022202	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	28.77	28.77	0.000	
A02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 7 00000007	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.43	29.43	0.000	qualitative
B02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 8 00000008	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.54	29.54	0.000	qualitative
C01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 1 00000001	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.22	29.22	0.000	qualitative
D01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 2 00000002	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.49	29.49	0.000	qualitative
E01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 3 00000003	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.50	29.50	0.000	qualitative
F01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 4 00000004	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.49	29.49	0.000	qualitative
G01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 5 00000005	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.27	29.27	0.000	qualitative
H01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 6 00000006	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5	29.67	29.67	0.000	qualitative

Figura 14: Relatório: Quantification Data (Dados de Quantificação)

Os resultados qualitativos estão assinalados com o termo *qualitative* (qualitativo) na coluna **Well Note** (Nota do Poço) da tabela Quantification Data (Dados de Quantificação).

- Identifique cada linha com o **Target** (Alvo) *HAV* e o termo *qualitative* (qualitativo) na coluna **Well Note** (Nota do Poço).
- Nestas linhas, consulte a coluna **C_q** para o resultado da respetiva **Sample** (Amostra).
- Consulte a tabela 9 para a interpretação de resultados.

Tabela 9: Interpretação de resultados

Ciclo limiar (C _q) do alvo de HAV	Interpretação de resultados
1–45	ARN específico de HAV detetado.
N/A	Nenhum ARN específico do HAV detetado. A amostra não contém quantidades detetáveis de ARN específico do HAV.

7.6.11 Análise de dados PCR e interpretação automatizada de resultados utilizando o FastFinder

Opcionalmente, a análise de dados PCR e a interpretação automatizada de resultados pode ser feita utilizando o FastFinder Standalone e o plug-in de ensaio do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5. A versão válida do plug-in de ensaio está listada no capítulo 3.2 Plug-in de ensaio do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.

Para mais informações sobre o FastFinder Standalone, consulte as respetivas instruções de utilização.

NOTA



O plug-in de ensaio do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 tem como finalidade ajudar na interpretação dos resultados gerados com o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 no CFX96™ DW Dx. Todos os resultados gerados com o plug-in de ensaio têm de ser verificados quanto à validade e correção por um operador humano.

1. Inicie a aplicação FastFinder Standalone no AltoStar® Automated Analysis PC.
2. Introduza os seus dados de utilizador e a sua palavra-passe para iniciar sessão. É apresentado o ecrã inicial. Pode aceder a todas as análises abertas e autorizadas.
3. Clique em **Create new analysis** (Criar nova análise).
4. Procure o ficheiro de dados a analisar e selecione-o clicando em **Open** (Abrir). Apenas são suportados ficheiros .PCRD. O ficheiro é carregado e analisado. Depois de terminar a análise, é apresentado **Ready for review** (Pronto para revisão).

NOTA



É altamente recomendável analisar apenas um ficheiro de dados PCR (.PCRD) de cada vez, ao invés de analisar vários processamentos PCR em lotes.

5. Clique no processamento PCR para iniciar o processo de revisão.
6. Verifique os controlos e resolva as eventuais mensagens de erro com base nos avisos das amostras individuais.

NOTA

Certifique-se de que confirma as amostras não testáveis como inconclusivas e de que volta a extrair e a testar as amostras.

7. Autorizar ou reiniciar a análise.

Depois de clicar em **Authorize** (Autorizar), a análise é automaticamente transferida como ficheiro .CSV. Os documentos em PDF só podem ser transferidos a partir de análises autorizadas. Clique no botão **Actions** (Ações) no canto superior direito e seleccione **Generate PDF Export** (Gerar exportação em PDF). Acceda a **Downloads** (Transferências) através do mesmo menu para abrir o ficheiro.

8. Utilizar o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 com outros instrumentos PCR em tempo real que não sejam o CFX96™ Deep Well Dx System

Além do CFX96™ DW Dx, o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 foi validado com outros instrumentos de PCR em tempo real (consulte o capítulo 5.3.2 Outras ordens das tarefas). Os capítulos seguintes 8.1 Materiais e dispositivos necessários mas não fornecidos e 8.2 Procedimento descrevem como utilizar o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 com estes instrumentos.

8.1 Materiais e dispositivos necessários mas não fornecidos

São necessários os seguintes instrumentos, software e materiais:

- Materiais e dispositivos gerais (consulte o capítulo 7.5 Materiais e dispositivos gerais)
- CFX96™ Deep Well Dx System e o software CFX Manager™ Dx versão 3.1 (Bio-Rad)
 - Placas PCR com 96 poços e película de selagem (para mais pormenores, consulte a tabela 2)

- CFX96™ Dx System e o software CFX Manager™ Dx versão 3.1 (Bio-Rad)
 - Placas PCR com 96 poços e película de selagem (para mais pormenores, consulte a tabela 2)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform e Rotor-Gene® Q Software versão 2.3.1 (QIAGEN)
 - Tubos de 0,1 ml em tiras e tampas [STRIP Tubes 0.1 ml (Tubos em TIRAS 0,1 ml) para cicladores Rotor-Gene® (LTF Labortechnik) ou equivalente]
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System e QuantStudio™ 5 Dx Software v1.0.2 e ABI Prism® 7500 SDS e 7500 Software v2.3 (Applied Biosystems)
 - Placas PCR com 96 poços e película de selagem [MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate e MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems) ou equivalente]
- LightCycler® 480 Instrument II e LightCycler® 480 Software versão 1.5.1 (Roche)
 - Placas PCR com 96 poços e película de selagem [LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, branco e LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche) ou equivalente]

NOTA



Não se recomenda a utilização de outros materiais ou dispositivos que não estejam especificados nestas instruções de utilização.

8.2 Procedimento

8.2.1 Preparação de amostras

O kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 foi validado utilizando o AltoStar® AM16 em combinação com o kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

O kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 tem de ser utilizado com um IC heterólogo [AltoStar® Internal Control 1.5 (controlo interno)], que permite controlar o procedimento de preparação de amostras (extração de ácido nucleico) e o RT-PCR seguinte.

O volume do IC adicionado à mistura amostra/tampão de lise depende do volume de eluição. Este representa 50 % do volume da eluição.

ATENÇÃO

O armazenamento de eluatos nas condições erradas poderá provocar a degradação da sequência-alvo do HAV, o que poderia comprometer o desempenho do produto.

8.2.2 Preparação da master mix

Todos os componentes do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 e amostras devem ser completamente descongelados, misturados (através de pipetagem ou por agitação ligeira em vortex) e centrifugados brevemente antes da utilização. Prepare a master mix de acordo com o esquema de pipetagem seguinte:

Tabela 10: Esquema de pipetagem (preparação da master mix)

Número de reações (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Volume da master mix	20 µl	240 µl

ATENÇÃO

Não utilize volumes diferentes de Master A e Master B para a preparação da master mix que não sejam os especificados nestas instruções de utilização, pois tal poderia comprometer o desempenho do produto.

ATENÇÃO

A falta de centrifugação dos componentes do produto após a descongelação poderá provocar contaminação com resíduos de reagentes nas tampas, o que poderia comprometer o desempenho do produto.

8.2.3 Preparação da reação

1. Pipete 20 µl da master mix para cada poço necessário de uma placa PCR ótica com 96 poços adequada ou um tubo de reação ótico adequado.
2. Adicione 10 µl da amostra (eluato da extração de ácido nucleico) ou 10 µl dos controlos (PC ou NTC).

Tabela 11: Esquema de pipetagem (preparação de reação)

Preparação da reação	
Master mix	20 µl
Amostra ou controlo	10 µl
Volume total	30 µl

3. Certifique-se de que é utilizado pelo menos 1 PC e 1 NTC por processamento.
4. Misture cuidadosamente as amostras e os controlos com a master mix através de pipetagem para cima e para baixo.
5. Feche a placa PCR com 96 poços com uma película de selagem de placa PCR e os tubos de reação com tampas adequadas (consulte o capítulo 8.1 Materiais e dispositivos necessários, mas não fornecidos).
6. Centrifugue a placa PCR com 96 poços numa centrifugadora com rotor para placas de microtitulação durante 30 segundos a aproximadamente 1 000 x g (~ 3 000 rpm).

O NTC contém sempre o modelo IC na concentração correta.

Após a conclusão da configuração PCR, a mistura PCR mantém-se estável à temperatura ambiente (máx. +30 °C) durante 30 minutos.

ATENÇÃO



Não exceda o tempo de armazenamento da mistura PCR, pois tal poderia comprometer o desempenho do produto.

ATENÇÃO

Não misture amostras ou ID de amostras durante a configuração PCR ou transferência para o instrumento PCR. Tal poderia conduzir a resultados falsos positivos ou falsos negativos devido à atribuição incorreta das amostras.

8.2.4 Processamento PCR

8.2.4.1 Programação do instrumento PCR em tempo real

Para obter informações básicas relativas à configuração e programação dos diferentes instrumentos PCR em tempo real, consulte as instruções de utilização do respetivo instrumento.

Para obter instruções de programação detalhadas relativamente à utilização do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 em instrumentos PCR em tempo real específicos, contacte o apoio técnico da Altona Diagnostics (consulte o capítulo 12. Apoio técnico).

8.2.4.2 Definições de processamento

Configure as seguintes definições básicas:

Tabela 12: Definições de processamento

Definições	
Volume de reação	30 µl
Taxa de rampa	Predefinição
Referência passiva*	ROX™

* Se aplicável

Defina os detetores de fluorescência (corantes) seguintes:

Tabela 13: Detetores de fluorescência

Alvo	Nome do detetor	Reporter	Quencher
HAV	HAV	FAM™	(Nenhum)
IC	Internal Control	JOE™	(Nenhum)

Defina o perfil de temperatura e a aquisição de corante seguintes:

Tabela 14: Perfil de temperatura e aquisição de corante

	Fase	Repetições do ciclo	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min:s]
Transcrição reversa	Suspensão	1	-	55	20:00
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	02:00
Amplificação	Realização de ciclo	45	-	95	00:15
			Sim	55	00:45
			-	72	00:15

ATENÇÃO



Não utilize outras condições de realização do ciclo que não sejam as especificadas nestas instruções de utilização, pois tal poderia comprometer o desempenho do produto.

8.2.5 Análise de dados

Para obter informações básicas relativas à análise de dados em instrumentos PCR em tempo real específicos, consulte as instruções de utilização do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à análise dos dados gerados com o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 em diferentes instrumentos PCR em tempo real, contacte o apoio técnico da Altona Diagnostics (consulte o capítulo 12. Apoio técnico).

Os critérios para a validade dos processamentos PCR de diagnóstico e a interpretação de resultados independentemente do instrumento PCR em tempo real são descritos nos capítulos 7.6.8.2 Validade de um processamento PCR de diagnóstico e 7.6.8.3 Validade dos resultados para uma amostra, capítulo 7.6.10.1 Interpretação manual dos resultados e tabela 9.

ATENÇÃO



Não utilize outras definições de controlo para análise de dados que não sejam as especificadas nestas instruções de utilização, uma vez que tal poderia causar resultados de exames IVD incorretos.

ATENÇÃO



À semelhança de qualquer outro teste de diagnóstico, os resultados devem ser interpretados tendo em consideração todos os dados clínicos e laboratoriais.

9. Dados de desempenho

O desempenho do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 foi avaliado em conformidade com a Norma Internacional da OMS «2nd and 3rd WHO International Standard for hepatitis A virus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 00/562 e 15/276, respectively) e material normalizado HAV calibrado de acordo com a norma internacional da OMS.

Os dados de desempenho foram obtidos com o AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 utilizando o AltoStar® Workflow (ordem das tarefas). Foi demonstrado um desempenho equivalente em termos de especificidade, sensibilidade e precisão para os outros instrumentos PCR em tempo real no capítulo 5.3.2 Outras ordens das tarefas.

9.1 Plasma

9.1.1 Sensibilidade analítica

Para determinação do limite de detecção (LDD), foi gerada uma série de diluições da Norma Internacional da OMS «3rd WHO International Standard for hepatitis A virus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 15/276)» em plasma variando de 1,00E+02 a 2,50E-01 UI/ml.

Cada diluição foi testada em 8 réplicas em 3 processamentos diferentes (total n = 24 por diluição) utilizando combinações de:

- 3 lotes de kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5
- 3 lotes de kit AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lotes de AltoStar® Internal Control 1.5 (controlo interno)
- 3 instrumentos AltoStar® AM16
- 3 instrumentos CFX96™ DW Dx

Os dados de todos os processamentos foram combinados e foi realizada uma análise de probit para determinar o valor do LDD de 95 %.

Tabela 15: Resultados PCR utilizados para calcular a sensibilidade analítica do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5

Concentração [UI/ml]	N [total]	N [positivo]	Taxa de positividade [%]
1,00E+02	24	24	100
5,00E+01	24	24	100
2,50E+01	24	24	100
1,00E+01	24	24	100
5,00E+00	24	23	96
2,50E+00	24	16	67
1,00E+00	24	12	50
5,00E-01	24	4	17
2,50E-01	24	3	13

O LDD do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 para a detecção de HAV no plasma é de 6,31 UI/ml (intervalo de confiança de 95 %: 4,17–11,99 UI/ml).

9.1.2 Especificidade analítica

A especificidade analítica do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 é garantida pela seleção meticulosa dos oligonucleotídeos (primers e sondas). Os oligonucleotídeos foram verificados por análise de comparação das sequências com sequências publicamente disponíveis, para garantir que todos os genótipos de HAV relevantes serão detetados.

Para verificação da especificidade analítica do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5, foram realizados os seguintes ensaios (consulte os capítulos 9.1.2.1 Amostras negativas a 9.1.2.3 Reatividade cruzada).

9.1.2.1 Amostras negativas

Foram testadas 35 amostras de plasma negativas de HAV de doadores individuais com o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5. Todas as amostras testadas (35 de 35) mostraram resultados negativos para o ARN específico do HAV e positivos para o IC. A especificidade analítica do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 para amostras de plasma é $\geq 95\%$.

9.1.2.2 Substâncias interferentes

Para avaliar a influência de substâncias endógenas potencialmente interferentes no desempenho do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5, foram fortificadas substâncias selecionadas em amostras de plasma. Essas amostras de plasma continham HAV numa concentração de $3 \times \text{LDD}$ ($1,90\text{E}+01 \text{ UI/ml}$) e nenhum HAV, respectivamente.

Os resultados obtidos de amostras com substâncias potencialmente interferentes foram comparados com os resultados gerados de amostras de plasma sem interferente adicionado. Cada amostra foi processada em 3 réplicas.

Não foi observada qualquer interferência para as amostras contendo níveis elevados de:

- Substâncias endógenas
 - Bilirrubina
 - Hemoglobina
 - ADN genómico humano
 - Albumina sérica humana
 - Triglicéridos

ATENÇÃO



A presença de inibidores de PCR (por ex., heparina) poderia causar resultados inválidos ou falsos negativos.

9.1.2.3 Reatividade cruzada

A especificidade analítica do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 no que respeita à reatividade cruzada com outros agentes patogénicos que não o HAV foi avaliada testando:

- Vírus relacionados com HAV
- Vírus que provocam sintomas semelhantes a uma infeção com HAV
- Vírus que se encontram provavelmente presentes em pacientes que têm uma infeção de HAV

O kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 não reagiu com qualquer um dos seguintes agentes patogénicos:

- Coxsackievírus A3
- Citomegalovírus (CMV)
- Enterovírus 71
- Vírus Epstein-Barr (EBV)
- Vírus da hepatite B (HBV)
- Vírus da hepatite C (HCV)
- Vírus da hepatite E (HEV)
- Vírus herpes simplex 1 (HSV-1)
- Vírus herpes simplex 2 (HSV-2)
- Vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1)
- Parvovírus B19
- Vírus da rubéola
- Rubulavirus (RuV)
- Vírus Varicella-zoster (VZV)
- Vírus da febre-amarela

ATENÇÃO



No caso de a amostra conter outros agentes patogénicos que não o HAV, poderá haver concorrência com a amplificação alvo ou reatividades cruzadas, causando resultados de exames IVD incorretos.

9.1.3 Reatividade

A especificidade do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 no que diz respeito à detecção de genótipos de HAV é garantida, sobretudo, pela seleção dos primers e sondas. Para verificar que o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 permite a detecção de outros genótipos de HAV que não HAV foi testada 1a [2nd WHO International Standard for hepatitis A virus (NIBSC code: 00/562)] e 1b [3rd WHO International Standard for hepatitis A virus (NIBSC code: 15/276)], HAV 2a e 3a com o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5. Os HAV 2a e 3a foram detetados como positivos com o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.

ATENÇÃO



A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma do HAV abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar em na incapacidade de detecção da presença do agente patogénico.

9.1.4 Precisão

A precisão do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 foi avaliada utilizando um painel constituído por:

- 1 amostra de plasma altamente positiva (3,15E+02 UI/ml) de HAV
- 1 amostra de plasma fracamente positiva [1,90E+01 UI/ml (3 x LDD)] de HAV
- 1 amostra de plasma negativa de HAV

Os dados foram determinados com base em:

- Valores do ciclo limiar (C_q^*) para a amostra altamente positiva de HAV
- Valores do ciclo limiar (C_q^*) para o IC na amostra negativa de HAV

* Tenha em atenção que o termo C_q escolhido é equivalente à designação de C_t , que podia ser utilizada por outros cicladores que não o CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad).

Os dados de repetibilidade foram gerados de acordo com as recomendações da diretriz CLSI EP05-A3 («Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition») [3]. Cada constituinte do painel foi testado em duplicado, em 2 processamentos por dia, durante 20 dias, por um operador utilizando:

- 1 lote de kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5
- 1 lote de kit AltoStar® Purification Kit 1.5
- 1 lote de kit AltoStar® Internal Control 1.5
- 1 instrumento AltoStar® AM16
- 1 instrumento CFX96™ DW Dx

Na tabela 16, são apresentadas as estimativas da repetibilidade e da precisão intralaboratorial como desvio-padrão (DP) e como coeficiente de variação (CV %) com base nos valores de C_q obtidos para a amostra altamente positiva para HAV e para o IC na amostra negativa para HAV. Os dados de precisão apresentados foram obtidos através da análise manual dos dados com o software CFX Manager™ Dx e utilizando a interpretação de resultados automatizada do FastFinder Standalone e do plug-in de ensaio do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.

Tabela 16: Repetibilidade e precisão intralaboratorial para o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5

		Repetibilidade			Precisão intralaboratorial	
CFX Manager™ Dx software						
Amostra	Média (valores C _q)	DP (valores C _q)	CV %	DP (valores C _q)	CV %	
Altamente positiva	30,27	0,11	0,36	0,13	0,42	
Negativo	29,37	0,10	0,35	0,14	0,47	
Plug-in de ensaio do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5						
Amostra	Média (valores C _q)	DP (valores C _q)	CV %	DP (valores C _q)	CV %	
Altamente positiva	28,29	0,12	0,44	0,32	1,12	
Negativo	27,84	0,13	0,46	0,36	1,30	

Todas as amostras testadas a 3 x LDD (amostra fracamente positiva) foram detetadas como positivas e todas as amostras negativas apresentaram resultados negativos com CFX Manager™ Dx software e o plug-in de ensaio do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.

Para garantir a reprodutibilidade, cada membro do painel foi testado em 6 réplicas em 3 processamentos por 3 operadores, utilizando:

- 3 lotes de kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5
- 3 lotes de kit AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lotes de AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 instrumentos AltoStar® AM16
- 3 instrumentos CFX96™ DW Dx

Na tabela 17, são apresentadas as estimativas da reprodutibilidade como desvio-padrão (DP) e como coeficiente de variação (CV %) com base no C_q obtido para a amostra altamente positiva para HAV e o IC na amostra negativa para HAV. Os dados de precisão apresentados foram obtidos através da análise manual dos dados com o software CFX Manager™ Dx e utilizando a interpretação de resultados automatizada do FastFinder Standalone e do plug-in de ensaio do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.

Tabela 17: Reprodutibilidade para o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5

		Reprodutibilidade	
CFX Manager™ Dx software			
Amostra	Média (valores C_q)	DP (valores C_q)	CV %
Altamente positiva	30,53	0,26	0,85
Negativo	29,57	0,19	0,66
Plug-in de ensaio do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5			
Amostra	Média (valores C_q)	DP (valores C_q)	CV %
Altamente positiva	28,37	0,17	0,61
Negativo	27,30	0,17	0,63

Todas as amostras testadas a 3 x LDD (amostra fracamente positiva) foram detetadas como positivas e todas as amostras negativas apresentaram resultados negativos com CFX Manager™ Dx software e o plug-in de ensaio do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5.

9.1.5 Taxa de insucesso total

A solidez do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 foi avaliada através do teste de 33 amostras de plasma negativas para HAV, de dadores individuais, fortificadas com HAV para uma concentração final de 3 x LDD ($1,90E+01$ UI/ml). Todas as amostras testadas (33 de 33) mostraram resultados positivos no canal de detecção por fluorescência específico do HAV (FAM™).

9.1.6 Transferência

A transferência é essencialmente um risco dependente da ordem das tarefas e independente do ensaio PCR utilizado. Para a AltoStar® Workflow (ordem das tarefas), utilizou-se o kit AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5 como modelo exemplar. A potencial contaminação cruzada através de transferência de amostras altamente positivas foi avaliada testando alternativamente amostras altamente positivas do parvovírus B19 (1,00E+07 UI/ml) e amostras negativas (n = 44 cada por processamento; 5 processamentos) com o kit AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5. Não foi observada transferência, ou seja, todas as amostras negativas do parvovírus B19 tiveram um resultado negativo.

9.1.7 Desempenho clínico

O kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 foi avaliado num estudo comparativo com o AmpliSens® HAV-FRT PCR Kit (AmpliSens Ecoli Dx, s.r.o.) com marcação CE. Foram testadas retrospectivamente em paralelo 145 amostras de plasma humano:

O AmpliSens® HAV-FRT PCR Kit (AmpliSens Ecoli Dx, s.r.o.) foi utilizado em combinação com o instrumento NucliSENS® easyMAG (bioMérieux) e o instrumento RotorGene® 6000 (QIAGEN), respetivamente o instrumento Mx3000P (Agilent).

O kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 foi utilizado em combinação com o kit AltoStar® Purification Kit 1.5 e o AltoStar® Internal Control 1.5 (controlo interno) no AltoStar® AM16 e no CFX96™ DW Dx.

Para a análise qualitativa, foram excluídas todas as amostras com um resultado inválido para um ou ambos os ensaios.

Os resultados das 139 amostras restantes são apresentados na tabela 18.

Tabela 18: Resultados da avaliação da sensibilidade e da especificidade de diagnóstico do HAV em amostras de plasma

		AmpliSens® HAV-FRT PCR Kit (AmpliSens Ecoli Dx, s.r.o.)	
		POSITIVO	NEGATIVO
AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5	POSITIVO	68	2
	NEGATIVO	0	69

A sensibilidade e a especificidade de diagnóstico do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 em comparação com o AmpliSens® HAV-FRT PCR Kit (AmpliSens Ecoli Dx, s.r.o.) foram de 100 % e 97 %, respetivamente.

10. Eliminação

Elimine os resíduos perigosos e biológicos em conformidade com os regulamentos nacionais e locais. Os resíduos e os componentes excedentes não devem entrar em contacto com redes de esgoto, cursos de água ou o solo.

ATENÇÃO



As amostras devem ser sempre tratadas como sendo infecciosas e com risco (biológico), em conformidade com os procedimentos laboratoriais e de segurança. No caso de derrames de material da amostra, utilize imediatamente um desinfetante apropriado. Manuseie os materiais contaminados como se se tratassem de materiais com risco biológico.

ATENÇÃO



A eliminação de resíduos perigosos e biológicos deve cumprir os regulamentos nacionais e locais para evitar a contaminação ambiental.

NOTA



A placa PCR tem de ser eliminada selada uma vez que a película de selagem da placa PCR não pode ser removida.

11. Controlo de qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade da Altona Diagnostics GmbH, certificado pela EN ISO 13485, cada lote de kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 é testado face a especificações predeterminadas de modo a garantir uma qualidade do produto consistente.

12. Apoio técnico

Para apoio ao cliente, contacte o apoio técnico da Altona Diagnostics:

e-mail: support@altona-diagnostics.com

telefone: +49-(0)40-5480676-0

NOTA



Qualquer incidente grave que tenha ocorrido em relação a este produto deve ser comunicado à Altona Diagnostics e à autoridade competente do seu país.

13. Resumo de segurança e desempenho

O resumo de segurança e desempenho elaborado para o kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 poderá ser consultado na European Database on Medical Devices (EUDAMED): <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

14. Bibliografia

- [1] Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th Edition. ASM Press, 2011.
- [2] Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. *Infectious Diseases*, Third Edition. Mosby, 2010.
- [3] CLSI. *Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition*. CLSI document EP05-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

15. Marcas comerciais e isenções de responsabilidade

4s3™ (4titude); AltoStar® (altona Diagnostics); AmpliSens® (AmpliSens Ecoli Dx, s.r.o.); ABI Prism®, QuantStudio™ (Applied Biosystems); NucliSENS® (bioMérieux); CFX96™, CFX Manager™ (Bio-Rad); Rotor-Gene® (QIAGEN); LOINC® (Regenstrief Institute, Inc.); LightCycler® (Roche); FAM™, JOE™, MicroAmp™, VIC™ (Thermo Fisher Scientific).

Os nomes registados, marcas comerciais, etc. utilizados neste documento, mesmo onde não estão especificamente marcados como tal, não devem ser considerados como estando desprotegidos pela legislação.













O kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 é um produto com marcação CE de acordo com o Regulamento (UE) 2017/746 relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*.

Produto não licenciado junto da Health Canada e não autorizado ou aprovado pela FDA.

Não disponível em todos os países.

© 2025 altona Diagnostics GmbH. Todos os direitos reservados.

16. Símbolos

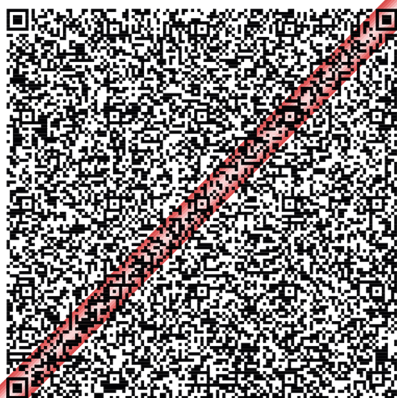
Símbolo	Explicação
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Número de item de comércio internacional
	Código do lote
	Conteúdo
	Cor da tampa
	Número de catálogo
	Número
	Componente
	Número de material
	Número da versão
	Versão
	Consulte as instruções de utilização

Símbolo	Explicação
	Contém o suficiente para «n» testes/reações (rxns)
	Limite de temperatura
	Data de validade
	Fabricante
	Data de fabrico
	Atenção
	Nota
	Contém material biológico de origem animal

17. Protocolo de ensaio para o AltoStar® Connect software e informação para a integração LIMS

Deve ser utilizado o código de barras 2D na figura 15, para instalar o protocolo de ensaio mais recente para utilização do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5 no AltoStar® AM16. O código de barras só pode ser lido em formato impresso. Pode ler o código de barras diretamente do manual ou imprimi-lo numa folha separada. Tenha em atenção que o tamanho da impressão afeta a capacidade de leitura do código de barras. Certifique-se de que dimensiona o tamanho para 100 %. Para a leitura, aponte o scanner para a linha vermelha no código de barras. Para pormenores sobre a gestão de protocolos de ensaio, consulte o respetivo capítulo nas instruções de utilização do AltoStar® Connect software. Para informação para a integração LIMS, consulte a tabela 20.

AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5



Protocol Version:

Checksum: C326507A464335D02618D2794862824FFF75E7DB

1

Figura 15: Código de barras do protocolo de ensaio do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5

Tabela 19: Registo de alterações para o protocolo de ensaio

Versão do protocolo	Atualizações dos lançamentos
1	Versão inicial

Tabela 20: Informação para a integração LIMS

Utilização	Dados
Ordem do teste (LIMS → AltoStar® AM16)	AltoStar HAV RT-PCR Kit 1.5
Resultado do teste (CFX96™ DW Dx → LIMS) unidade	N/A
Resultado do teste (CFX96™ DW Dx → LIMS) canal 1	HAV
Resultado do teste (CFX96™ DW Dx → LIMS) canal 2	Internal Control

Para o LOINC® (Logical Observation Identifiers Names and Codes), consulte o site da altona Diagnostics GmbH (www.altona-diagnostics.com) ou contacte o apoio técnico da altona Diagnostics (consulte o capítulo 12. Apoio técnico).

18. Histórico de revisões

Tabela 21: Histórico de revisões

Identificador	Data de emissão [mês/ano]	Modificações
MAN-AS0241540-PT-S04	12/2025	<ul style="list-style-type: none"> • Capítulo 1: eliminação da secção de texto «métodos de extração de ácido nucleico e» • Capítulos 2, 5, 5.4.2: especificação dos tipos de amostra • Capítulo 3: alteração do nome do capítulo para «Componentes do kit» • Capítulo «3.1 Reagentes» adicionado, com o conteúdo do antigo capítulo 3. • Capítulo «3.2 Plug-in de ensaio do kit AltoStar® HAV RT-PCR Kit 1.5» adicionado • Capítulo 5: adição da região-alvo • Capítulo 5.2: alteração do nome do capítulo para «Descrição do reagente» • Capítulos 5.3.1, 7, 7.4, 7.6.1, 7.6.11: adição do FastFinder para análise de dados e interpretação automatizada de resultados (opcional) • Capítulo 5.3.2: adição de conteúdo do antigo capítulo 5.3.2.2 • Capítulos 5.3.2, 8.1: adição de versões de software • Eliminação dos capítulos 5.3.2.1 e 5.3.2.2 • Capítulos 5.4.2, 6: adição de advertências • Capítulo 8.2.1: eliminação da descrição relativa à forma de proceder no caso de outros métodos de extração de ácido nucleico que não o AltoStar® AM16 • Capítulo 9: adição de informações relativas aos dados de desempenho de outros instrumentos de PCR em tempo real • Capítulo 9.1.4: substituição de dados de precisão com base em 5 execuções por dados de precisão gerados de acordo com a Diretriz CLSI EP05-A3

Identificador	Data de emissão [mês/ano]	Modificações
MAN-AS0241540-PT-S04	12/2025	<ul style="list-style-type: none">• Capítulo «13. Resumo de segurança e desempenho» adicionado• Capítulo 14: adição de referência para a Diretriz CLSI EP05-A3• Capítulo 15: substituição de «Diretiva Europeia 98/79/CE relativa ao diagnóstico <i>in vitro</i>» por «Regulamento (UE) 2017/746 relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i>»• Alterações editoriais

página deixada intencionalmente em branco

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com