

Instruções de utilização

AltoStar[®] SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5

10/2021 PT

AltoStar[®]

SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5

Para utilização com

CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)

CFX96™ Dx System (Bio-Rad)

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

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

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



AS0821547



1200



10 2021



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

Conteúdo

1.	Sobre estas instruções de utilização	8
2.	Utilização prevista.....	9
3.	Conteúdo do kit.....	10
4.	Armazenamento e manuseamento.....	11
4.1	Armazenamento	11
4.2	Manuseamento.....	12
4.2.1	Master A e Master B	12
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 dos componentes	14
5.2.1	Master A e Master B	14
5.2.2	Positive Control (controlo positivo).....	15
5.2.3	No Template Control (controlo negativo)	15
5.3	Ordens das tarefas	15
5.3.1	AltoStar® Workflow (ordem das tarefas)	15
5.3.2	Outras ordens das tarefas	16
5.3.2.1	Extração de ácido nucleico	16
5.3.2.2	Instrumentos PCR em tempo real	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	20

7.	Utilizar o kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 com a AltoStar® Workflow (ordem das tarefas)	22
7.1	Volume de amostra.....	22
7.2	Tubos de amostra.....	22
7.3	Códigos de barras da amostra	23
7.4	Materiais e dispositivos necessários mas não fornecidos para a AltoStar® Workflow (ordem das tarefas)	23
7.5	Materiais e dispositivos gerais.....	25
7.6	Procedimento	25
7.6.1	Perspetiva geral da AltoStar® Workflow (ordem das tarefas)	25
7.6.2	Programar um AltoStar® run (processamento)	31
7.6.3	Iniciar um processamento de configuração PCR	32
7.6.3.1	Preparação de reagentes para um processamento de configuração PCR	33
7.6.3.2	Carregar o AltoStar® AM16 para um processamento de configuração PCR	33
7.6.3.3	Durante o processamento de configuração PCR.....	37
7.6.4	Conclusão do processamento de configuração PCR.....	37
7.6.4.1	Resultados do processamento de configuração PCR.....	38
7.6.5	Selagem da PCR plate (placa PCR)	40
7.6.5.1	Estabilidade da mistura PCR	42
7.6.6	Iniciar um processamento PCR.....	42
7.6.6.1	Durante o processamento PCR	43
7.6.6.2	Atribuição de ensaios a grupos de poços	43
7.6.7	Análise de dados PCR	46
7.6.7.1	Correção da linha de base	48
7.6.7.2	Exclusão de sinais irregulares PCR.....	50
7.6.7.3	Definição de limiares	54
7.6.8	Validade dos resultados PCR.....	58

7.6.8.1	Exclusão de poços com dados inválidos.....	58
7.6.8.2	Validade de um processamento PCR de diagnóstico	61
7.6.8.3	Validade dos resultados para uma amostra	61
7.6.9	Exportação de resultados PCR para a interpretação automatizada de resultados	62
7.6.10	Exportação de resultados PCR para a interpretação manual de resultados	63
7.6.10.1	Interpretação manual dos resultados	65
8.	Utilizar o kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 com outros instrumentos PCR em tempo real que não sejam o CFX96™ Deep Well Dx System	67
8.1	Materiais e dispositivos necessários mas não fornecidos.....	67
8.2	Procedimento	68
8.2.1	Preparação de amostras	68
8.2.2	Preparação da master mix	69
8.2.3	Preparação da reação	69
8.2.4	Processamento PCR.....	71
8.2.4.1	Programação do instrumento PCR em tempo real	71
8.2.4.2	Definições de processamento	71
8.2.5	Análise de dados	72
9.	Dados de desempenho.....	73
9.1	Esfregaços respiratórios.....	73
9.1.1	Sensibilidade analítica.....	73
9.1.2	Especificidade analítica	75
9.1.2.1	Amostras negativas.....	76
9.1.2.2	Substâncias interferentes.....	76
9.1.2.3	Inclusividade.....	77
9.1.2.4	Reatividade cruzada.....	79
9.1.3	Precisão.....	80

9.1.4	Taxa de insucesso total	82
9.1.5	Transferência.....	82
9.1.6	Desempenho clínico	82
10.	Eliminação	84
11.	Controlo de qualidade	84
12.	Apoio técnico	85
13.	Bibliografia	85
14.	Marcas comerciais e isenções de responsabilidade.....	86
15.	Símbolos	87
16.	Protocolo de ensaio para o AltoStar® Connect software e informação para a integração LIMS	89
17.	Histórico de revisões.....	91

1. Sobre estas instruções de utilização

Estas instruções de utilização orientam o utilizador na utilização do kit AltoStar® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 em conjunto com outros métodos para a extração de ácido nucleico 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 (controlo interno) 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)

* “CFX96™ Deep Well Dx System” é a nova marca da versão IVD do CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (sistema de deteção) (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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 consiste num teste de diagnóstico *in vitro*, baseado em tecnologia PCR em tempo real, para a deteção qualitativa do ARN específico do coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) em espécimes de esfregaços respiratórios humanos. Destina-se a ser utilizado como auxiliar de diagnóstico de infeção por SARS-CoV-2.

Os resultados obtidos com o kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 têm de ser interpretados juntamente com outros dados clínicos e laboratoriais.

O kit AltoStar® SARS-CoV-2 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. Conteúdo do kit

O kit AltoStar® SARS-CoV-2 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⁾	100	60 ²⁾
Violeta	Master B ¹⁾	100	180 ³⁾
Vermelho	Positive Control (E gene + S gene) ⁴⁾	10	250
Branco	NTC ⁵⁾	10	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 a integralidade quanto ao número, tipo e conteúdos. Não utilize um produto defeituoso ou incompleto, o desempenho do produto poderia ficar comprometido.

O kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 contém reagentes suficientes para realizar 1200 reações num número máximo de 100 processamentos.

O produto é enviado em gelo seco. No momento da entrega e antes da primeira utilização, verifique o produto 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).

4. Armazenamento e manuseamento

Todos os reagentes incluídos no kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 são soluções prontas a usar.

4.1 Armazenamento

Todos os componentes do kit AltoStar® SARS-CoV-2 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 PCR plates (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

i

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 (controle positivo) e No Template Control (controle negativo)

1. Após a descongelação, o Positive Control (PC, controle positivo) e o No Template Control (NTC, controle 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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 consiste num teste de diagnóstico *in vitro* para a detecção qualitativa de ARN específico da linhagem B de betacoronavírus (gene E) e de SARS-CoV-2 (gene S) em espécimes de esfregaços respiratórios humanos.

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 da linhagem B de betacoronavírus (linhagem B-βCoV) e de SARS-CoV-2 e sondas específicas para o alvo com marcação fluorescente para a detecção do ADN amplificado.

Para além do sistema de detecção e amplificação específica do ARN do gene E e gene S, o ensaio inclui oligonucleotídeos para a amplificação e detecção do controlo interno [doravante abreviado como IC; AltoStar® Internal Control 1.5 (controlo interno)].

A sonda específica para o ARN do gene E está marcada com o fluoróforo FAM™ e a sonda específica para o ARN do gene S está marcada com o fluoróforo Cy5. 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 detecção paralela do ARN específico do gene E e gene S e do IC nos canais de detecção correspondentes do instrumento PCR em tempo real utilizado.

5.1 Informação de base

O coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) consiste num vírus de ARN de cadeia simples e sentido positivo pertencente à família *Coronaviridae*, género betacoronavírus, subgénero linhagem B.

O SARS-CoV-2 surgiu na região de Wuhan na China em dezembro de 2019, tendo-se espalhado pelo resto do mundo em 2 meses. O vírus foi inicialmente denominado 2019-nCoV (novo coronavírus), tendo o nome sido alterado para SARS-CoV-2 pelo “International Committee on Taxonomy of Viruses”, em 11.02.2020. Na mesma altura, a OMS atribuiu o nome COVID-19 à doença causada pelo SARS-CoV-2. Tendo em conta a rápida escalada e propagação da COVID-19 a nível mundial, em 12.03.2020 a OMS caracterizou o surto como uma pandemia.

O SARS-CoV-2 é altamente contagioso e transmite-se através de aerossóis e gotículas, provocando infeções respiratórias agudas com sintomas do tipo gripe. De uma maneira geral, mas não de forma exclusiva, nos idosos e em pessoas com doença pré-existente, a infeção com SARS-CoV-2 pode resultar em doença grave e potencialmente fatal. Foram referidos casos de infeção assintomática, doença ligeira, doença grave e mortes causadas pela doença [1,2].

5.2 Descrição dos componentes

5.2.1 Master A e Master B

O Master A e o 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 detecção alvo do ARN gene S específico do gene E e do gene S e do IC numa preparação de reação.

5.2.2 Positive Control (controle positivo)

O Positive Control (gene E + gene S) (controle positivo) contém concentrações padrão do ARN específico de linhagem B-βCoV e SARS-CoV-2. O PC é utilizado para verificar a funcionalidade dos sistemas de detecção e amplificação específicos de linhagem B-βCoV e SARS-CoV-2 incluídos no kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5.

5.2.3 No Template Control (controle negativo)

O NTC não contém ARN específico do linhagem B-βCoV e do SARS-CoV-2, mas contém o modelo de IC. O NTC é utilizado como controle negativo para a RT-PCR em tempo real específica do ARN do linhagem B-βCoV e do SARS-CoV-2 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 DIV:

- 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)

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 (controle interno).
3. Processamento de configuração RT-PCR no AltoStar® AM16 utilizando o kit AltoStar® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 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 PCR plates (placas PCR).

5.3.2 Outras ordens das tarefas

O kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 pode ser utilizado com ordens das tarefas compatíveis (manuais ou automatizadas). Os instrumentos PCR em tempo real que foram validados para utilização com o kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 são indicados no capítulo 5.3.2.2 Instrumentos PCR em tempo real. A utilização de procedimentos de extração alternativos tem de ser validada pelo utilizador.

5.3.2.1 Extração de ácido nucleico

O kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 pode ser utilizado com sistemas de extração de ácido nucleico que não sejam o AltoStar® AM16. Os procedimentos alternativos utilizados para a extração de ácido nucleico têm de ser validados pelo utilizador. Consulte o capítulo 8.2.1 Preparação de amostras para obter instruções relativamente à utilização do AltoStar® Internal Control 1.5 (controlo interno) em combinação com outros métodos de extração que não sejam o kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

5.3.2.2 Instrumentos PCR em tempo real

O kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 foi desenvolvido e validado com os seguintes instrumentos PCR em tempo real:

- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (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

O seguinte tipo de amostras pode ser utilizado com o kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5:

- Amostras de esfregaços respiratórios humanos colhidas em meio de transporte universal

ATENÇÃO



Não utilize outros tipos de amostras! A utilização de outros tipos de amostras pode comprometer o desempenho do produto.

5.4.2 Recolha e manuseamento de amostras

Para a recolha de amostras, é necessário utilizar esfregaços que estão à venda no mercado com ponta de poliéster ou fibra dácron e com hastes de plástico. Os esfregaços secos têm de ser colocados em ressuspensão em meio de transporte universal (por ex., UTM® da Copan). Não devem ser utilizados esfregaços de alginato de cálcio, esfregaços com hastes de madeira e/ou pontas de algodão, nem esfregaços de colheitas em gelatina de ágar. O transporte deve ser realizado de acordo com as instruções locais e nacionais relativas ao transporte de materiais biológicos.

Antes da utilização, os amostras de esfregaços respiratórios colocados em ressuspensão em UTM® não devem ser armazenados durante mais de 48 horas à temperatura ambiente (entre +20 °C e +25 °C), 5 dias entre +2 °C e +8 °C ou 2 meses 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.

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.

NOTA



As amostras não podem apresentar sólidos e componentes de alta viscosidade. Os sólidos e os componentes de alta viscosidade interferirão com a transferência de amostra no AltoStar® AM16 e as amostras não serão processadas.

NOTA



A utilização de esfregaços de alginato de cálcio poderá dar origem a resultados incorretos ou inválidos devido à inibição da PCR.

NOTA



A utilização de esfregaços com hastes de madeira e/ou pontas de algodão ou esfregaços com gelatina de ágar como meio de transporte poderá interferir com a transferência de amostra no AltoStar® AM16 devido a restos de madeira, algodão e/ou ágar e as amostras não serão processadas.

6. Advertências, precauções e limitações

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente a 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 PCR plates (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.
- Não utilize outros tipos de amostras! 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.
- O armazenamento de eluatos nas condições erradas poderá provocar a degradação da sequência-alvo do SARS-CoV-2, 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 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 DIV incorretos.
- No caso de a amostra conter outros agentes patogénicos que não o SARS-CoV-2, poderá haver concorrência com a amplificação alvo ou reatividades cruzadas, causando resultados de exames DIV 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 SARS-CoV-2 abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar em na incapacidade de deteção da presença do agente patogénico.

7. Utilizar o kit AltoStar® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 em conjunto com a AltoStar® Workflow (ordem das tarefas). A AltoStar® Workflow (ordem das tarefas) inclui diferentes produtos DIV [o AltoStar® AM16, o AltoStar® Connect software, o kit AltoStar® Purification Kit 1.5, o AltoStar® Internal Control 1.5 (controlo interno) e o CFX96™ DW Dx]. 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)

7.1 Volume de amostra

O kit AltoStar® SARS-CoV-2 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 (sistema de automação), 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 (sistema de automação)	PK15-16/ PK15-46
AltoStar® Internal Control 1.5	Extração de ácido nucleico e controlo de amplificação e deteção por PCR	IC15-16/ IC15-46
PCR Plate	Placa multipoços semi-skirted com 96 poços, com código de barras, com poços brancos	VK000005

Material	Descrição	N.º de encomenda
PCR Plate Sealing Foil	Película de selagem para a PCR plate (placa PCR)	VK000006
1,000 µl CO-RE Tips	Pontas com filtros de 1 000 µl para utilização com o AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automação)	VK000007
300 µl CO-RE Tips	Pontas com filtros de 300 µl para utilização com o AltoStar® Automation System AM16 (sistema de automação)	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 (sistema de automação)	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 (selador de placa)	VK000023
	por ex., PX1 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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5
- Centrifugadora para centrifugação de PCR plates (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® SARS-CoV-2 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 6–11 são descritos com mais pormenor nos capítulos 7.6.3 Iniciar um processamento de configuração PCR a 7.6.10 Exportação de resultados PCR para a interpretação manual de resultados.

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 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 já importado do LIMS: <ul style="list-style-type: none"> AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 Clique no botão Create Run (Criar Processamento) na barra de ferramentas para criar o AltoStar® run (processamento).

Passo	Ação
4. Iniciar um processamento de purificação	<ul style="list-style-type: none"> Na barra de menus clique em Purification → Start Purification (Purificação → Iniciar Purificação). Em alternativa, regresse ao Ecrã 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 aguarde 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 eluate plate (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 eluate plate (placa de eluato) com uma Eluate Plate Sealing Foil (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 Inicial e clique no botão Start PCR Setup (Iniciar Configuração PCR). Selecione o processamento de configuração PCR a iniciar para visualizar a eluate plate (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 centrífuga. Se a eluate plate (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 o instrumento em conformidade. 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® SARS-CoV-2 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.

Passo	Ação
8. Selar a PCR plate (placa PCR)	<ul style="list-style-type: none"> Selecione a PCR plate (placa PCR) com uma PCR Plate Sealing Foil (película de selagem da placa PCR).
9. Iniciar o processamento PCR	<ul style="list-style-type: none"> Ligue o CFX96™ DW Dx e o respectivo computador e monitor. Inicie o CFX Manager™ Dx software. Abra o CFX96™ DW Dx. Centrifugue a PCR plate (placa PCR) e insira-a no CFX96™ DW Dx. Selecione File → Open → LIMS File... (Ficheiro → Abrir → Ficheiro LIMS...) a partir da barra de menus. Digitalize o código de barras da PCR plate (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>
10. Separar ensaios para análise individual	<ul style="list-style-type: none"> Separe todos os ensaios no processamento PCR em grupos de poços distintos.
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 deteção utilizados. Exclua os poços com sinais irregulares de PCR. Defina os limiares de todos os canais de deteção de acordo com os controlos. Exclua os poços que contêm dados inválidos. Crie o ficheiro de resultados do LIMS para a exportação de resultados para o LIMS. Crie o relatório de resultados para a interpretação manual de resultados.

ATENÇÃO

O armazenamento de eluatos nas condições erradas poderá provocar a degradação da sequência-alvo do SARS-CoV-2, 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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 são indicadas abaixo:

- PC e NTC são selecionados.
- 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® SARS-CoV-2 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 16. 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

i

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 eluate plate (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® Automation System AM16 (sistema de automação) 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).

i

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 eluate plate (placa de eluato) preparada e os reagentes preparados nos transportes adequados.

- Troque apenas bastidores de pontas de 1000 µl **completamente vazios** por bastidores de pontas de 1000 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**i**

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 eluate plate (placa de eluato) necessária com o poço A1 à esquerda da posição da placa preta.
- Coloque uma PCR plate (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 eluate plate (placa de eluato) atualmente carregada, a eluate plate (placa de eluato) pode manter-se não selada na posição do transporte. Se **não** for o caso, sele e armazene a eluate plate (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 eluate plate (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 cicladador (.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**i**

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 Cycler File** (Criar Ficheiro Ciclador Bio-Rad) para gerar o ficheiro ciclador.

7.6.5 Selagem da PCR plate (placa PCR)

Após a conclusão do processamento de configuração PCR, a PCR plate (placa PCR) tem de ser selada com uma PCR Plate Sealing Foil (película de selagem da 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 (selador de placa) [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 PCR plate (placa PCR) no adaptador de placa do selador de placa.
5. Coloque uma PCR Plate Sealing Foil (película de selagem da placa PCR) na PCR plate (placa PCR) de forma que o texto impresso “THIS SIDE UP” (este lado para cima) fique legível. Certifique-se de que todos os poços da PCR plate (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 Altona Diagnostics para obter assistência (consulte o capítulo 12. Apoio técnico).

NOTA



Se a estrutura ou a PCR Plate Sealing Foil (película de selagem da placa PCR) estiver incorretamente colocada, a película pode colar 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 PCR Plate Sealing Foil (película de selagem da placa PCR), deixe o selador de placa arrefecer até atingir a temperatura ambiente e contacte o apoio técnico da Altona 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 PCR plate (placa PCR), a PCR Plate Sealing Foil (película de selagem da 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 PCR plate (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 PCR plate (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 PCR plate (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 PCR plate (placa PCR) selada para garantir que todo o líquido está no fundo dos poços.
8. Insira a PCR plate (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.

7.6.6.2 Atribuição de ensaios a grupos de poços

A AltoStar® Workflow (ordem das tarefas) processa um ou vários ensaios PCR simultaneamente numa única PCR plate (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 PCR plate (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 1).

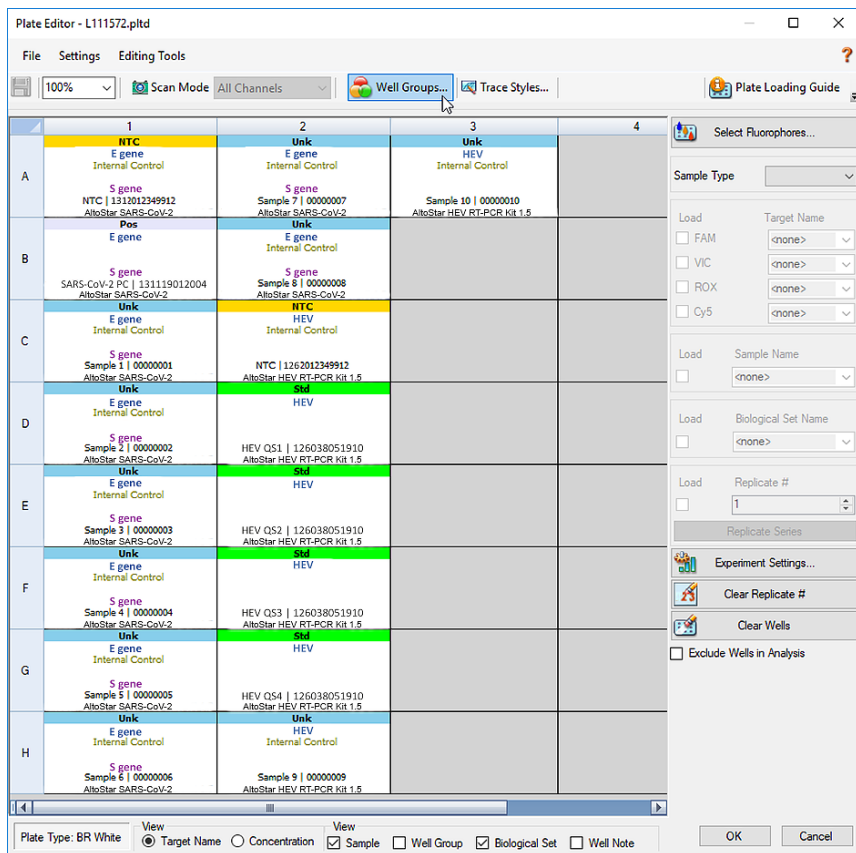


Figura 1: Caixa de diálogo Plate Editor (Editor de Placas)

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 2).
3. Clique no botão **Add** (Adicionar).
4. Digite o nome do primeiro ensaio na caixa de texto.

- Selecione todos os poços na área da PCR plate (placa PCR) que pertencem ao primeiro ensaio (consulte a figura 2). 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).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	Unk	Unk									
B	Pos	Unk										
C	Unk	NTC										
D	Unk	Std										
E	Unk	Std										
F	Unk	Std										
G	Unk	Std										
H	Unk	Unk										

Figura 2: Caixa de diálogo Well Groups Manager (Gestor de Grupos de Poços)

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

7.6.7 Análise de dados PCR

Os resultados de todos os ensaios (grupos de poços) na PCR plate (placa PCR) têm de ser analisados de acordo com a sequência ilustrada na figura 3.

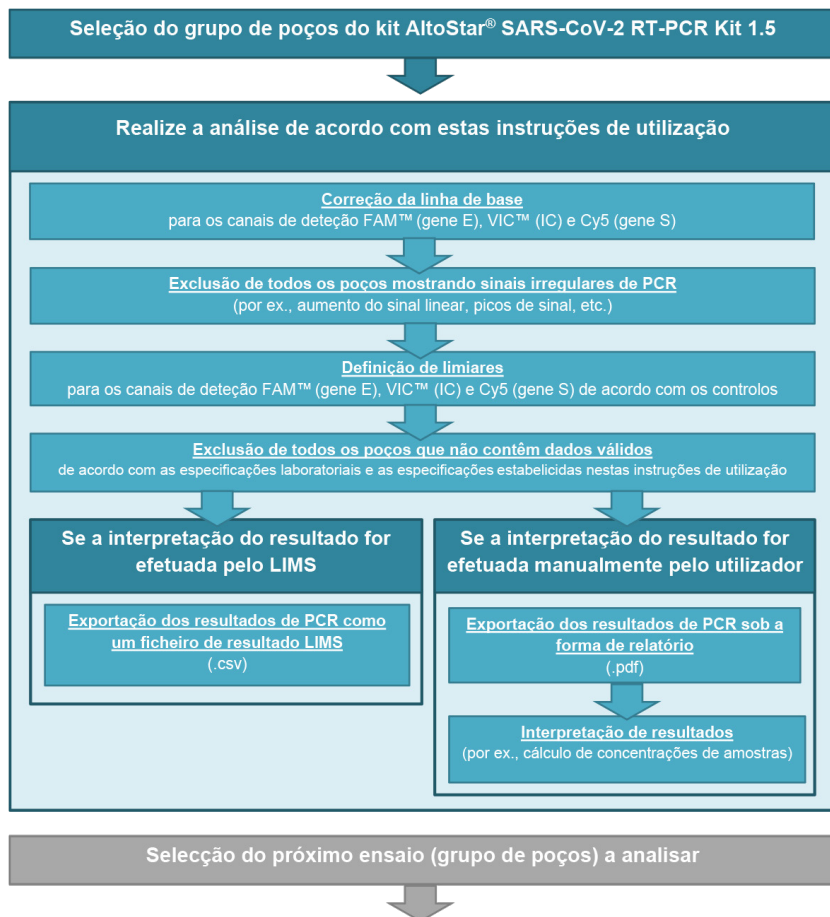


Figura 3: Processo de análise de dados PCR

Na janela Data Analysis (Análise de Dados), certifique-se de que seleciona o **Well Group** (Grupo de Poços) do kit AltoStar® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 contém todos os poços do kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 e não contém poços de outros ensaios.

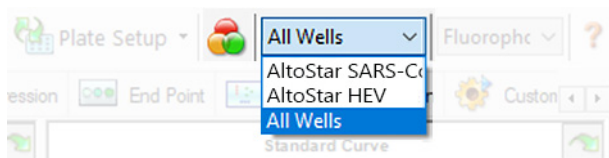


Figura 4: Botão Well Group (Grupo de Poços) e menu pendente Well Group (Grupo de Poços)

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.

7.6.7.1 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® SARS-CoV-2 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 do gene E.
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 ♦ 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).

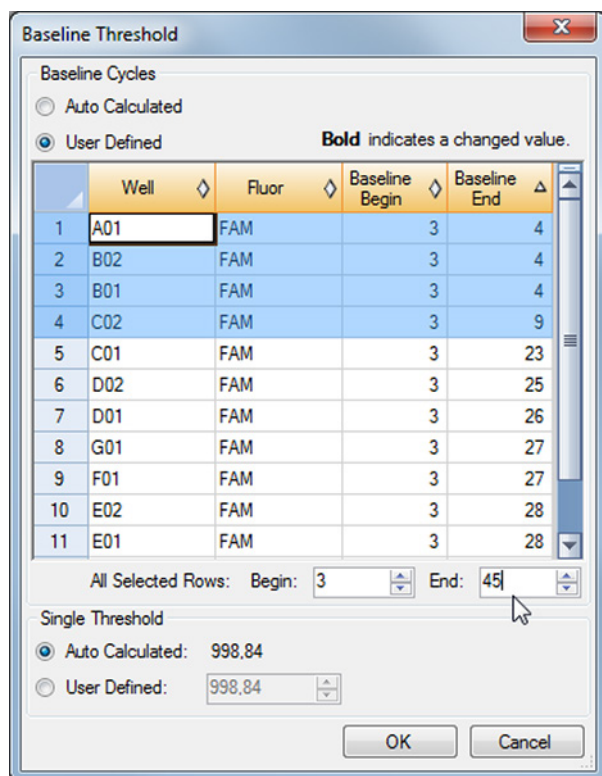


Figura 5: Caixa de diálogo Baseline Threshold (Limiar da Linha de Base)

6. Defina o valor no campo **End:** (Fim:) para 45 para as linhas selecionadas (consulte a figura 5).
7. Confirme as definições clicando em **OK**.
8. 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.
9. Repita os passos 3–7 para os canais de detecção VIC™ (IC) e Cy5 (gene S).

7.6.7.2 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® SARS-CoV-2 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™ (gene E), VIC™ (IC) ou Cy5 (gene S) (consulte a figura 6).

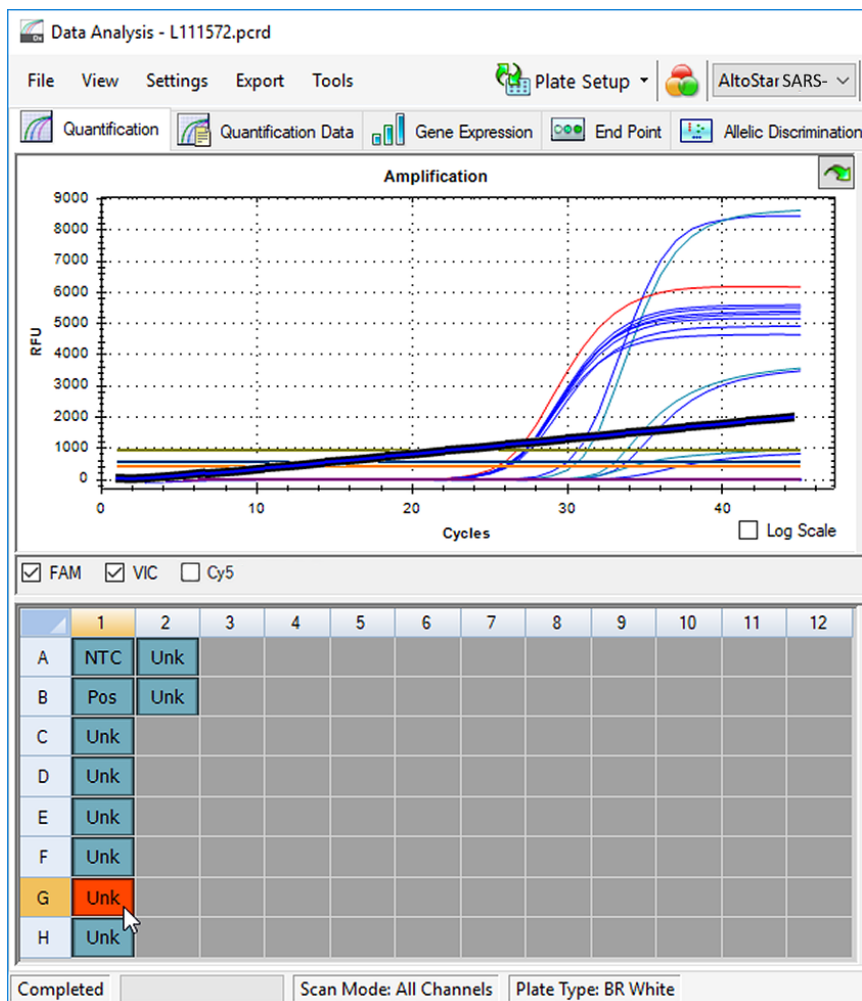


Figura 6: Janela Data Analysis (Análise de Dados): sinal PCR irregular

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).

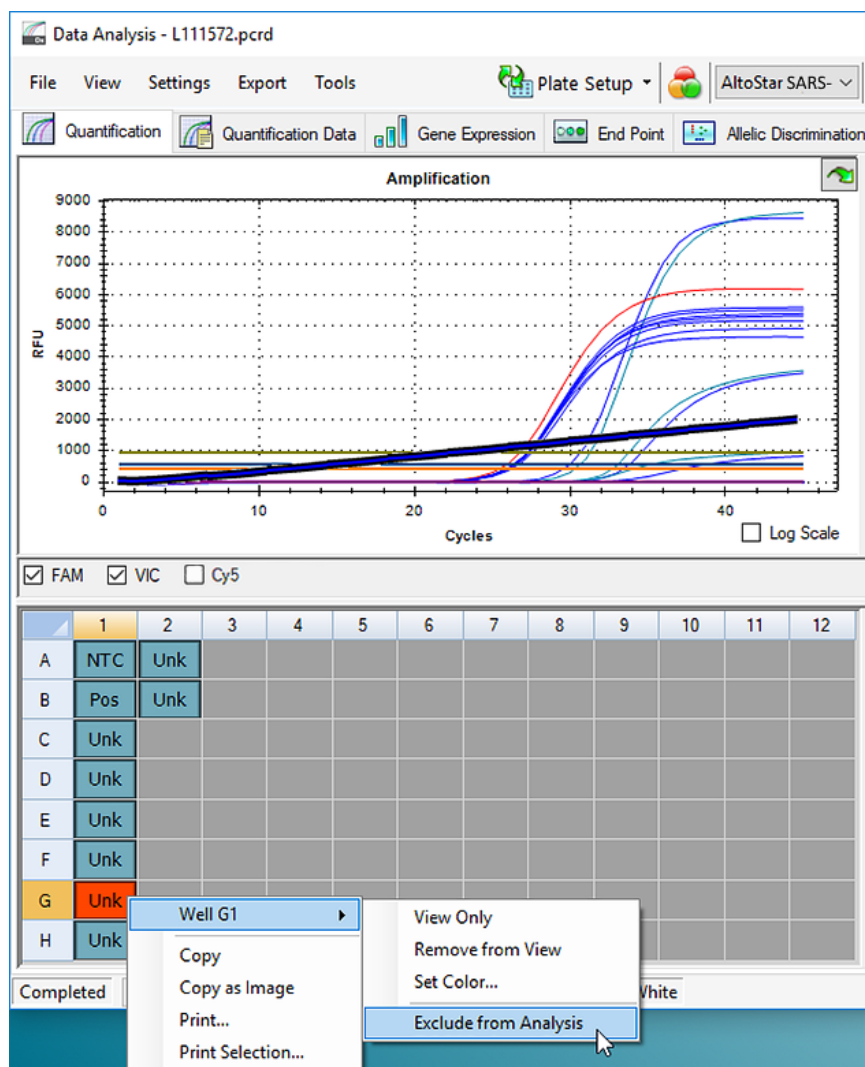


Figura 7: Janela Data Analysis (Análise de Dados): excluir poço da análise

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

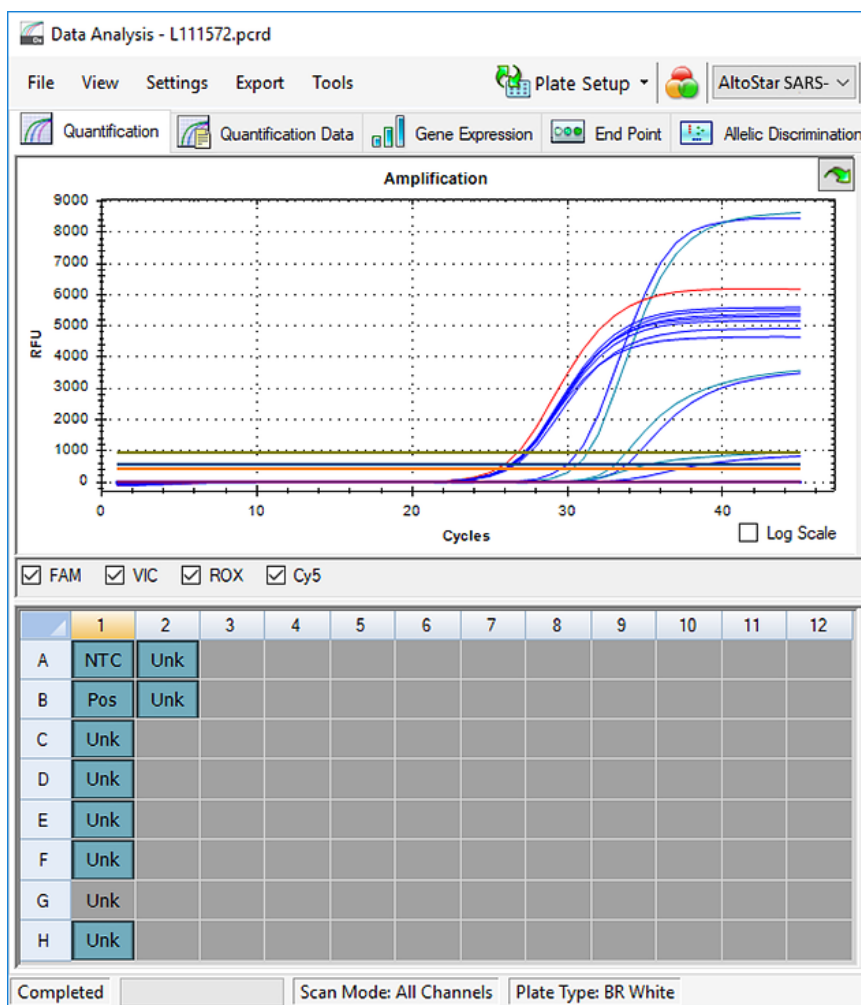


Figura 8: Janela Data Analysis (Análise de Dados): poço excluído

7.6.7.3 Definição de limiares

Os limiares para os canais de detecção FAM™ (gene E), VIC™ (IC) e Cy5 (gene S) 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® SARS-CoV-2 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.

- 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).

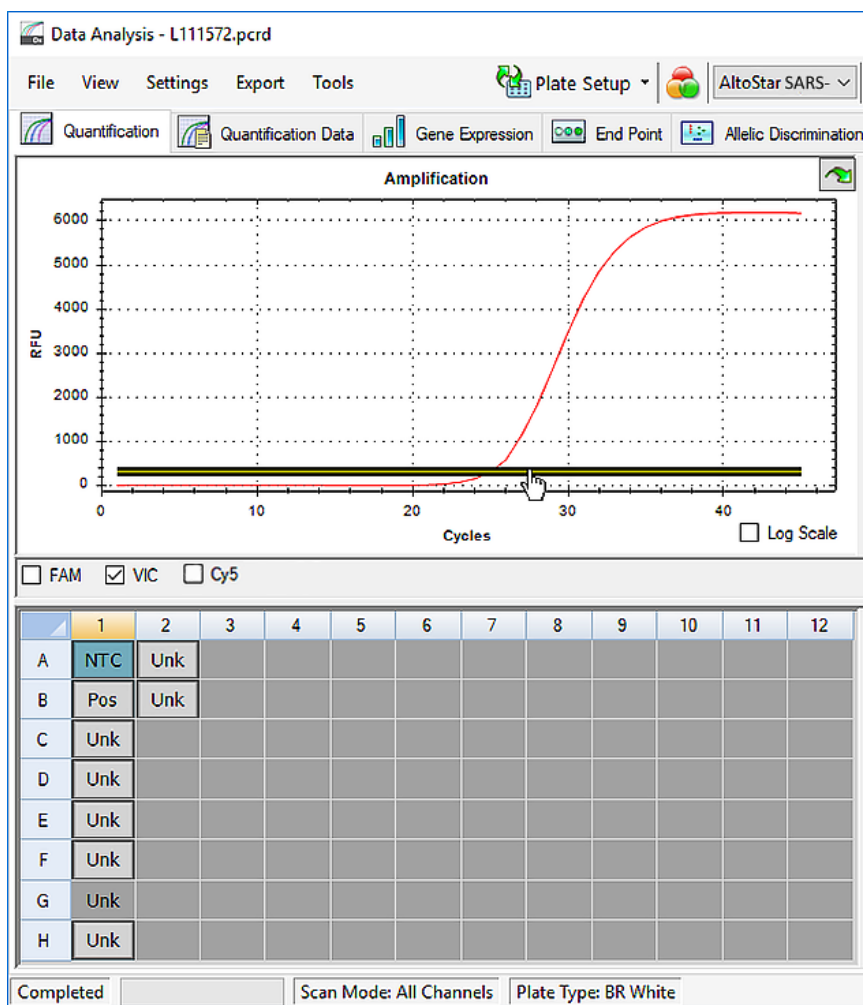


Figura 9: Janela Data Analysis (Análise de Dados): definição do limiar VIC™

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 gene E (consulte a figura 10).

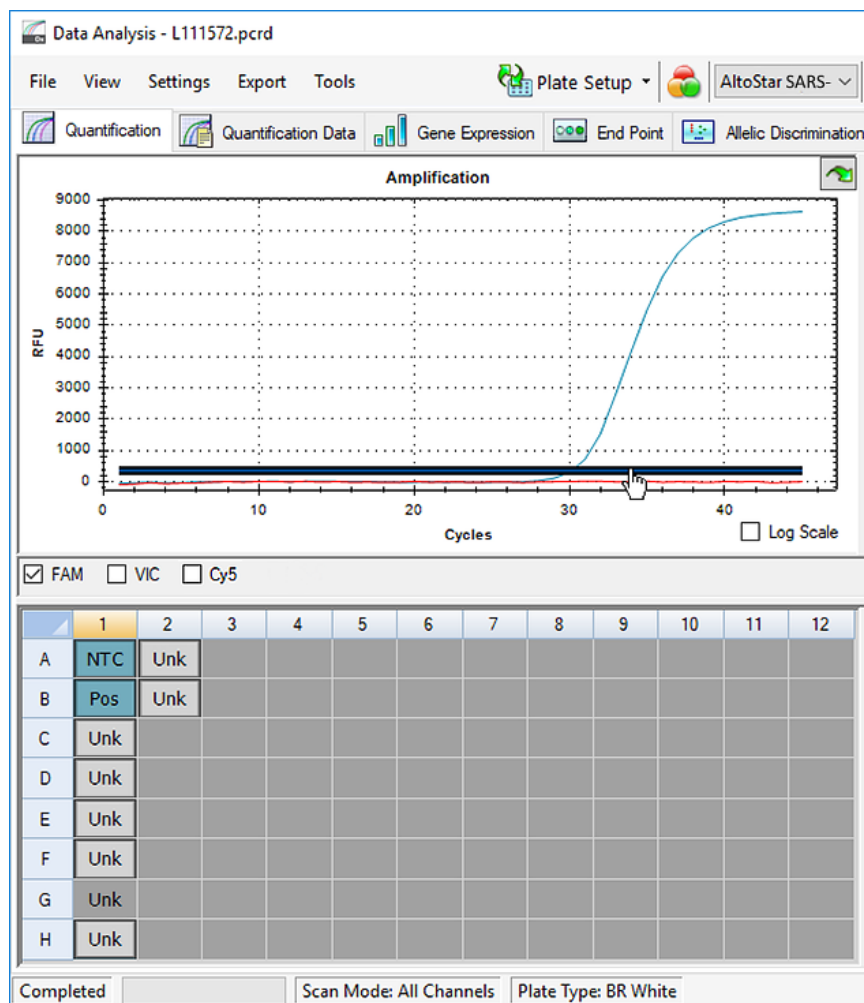


Figura 10: Janela Data Analysis (Análise de Dados): definição do limiar FAM™

- 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).
- Arraste o limiar bem acima do sinal de NTC para a área exponencial do sinal PC (consulte a figura 10).

8. Para o canal de detecção do gene S, anule a seleção da caixa de verificação **FAM** do lado esquerdo da janela Data Analysis (Análise de Dados) e assinale a caixa de verificação **Cy5** e repita os passos 6 e 7.

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® SARS-CoV-2 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).

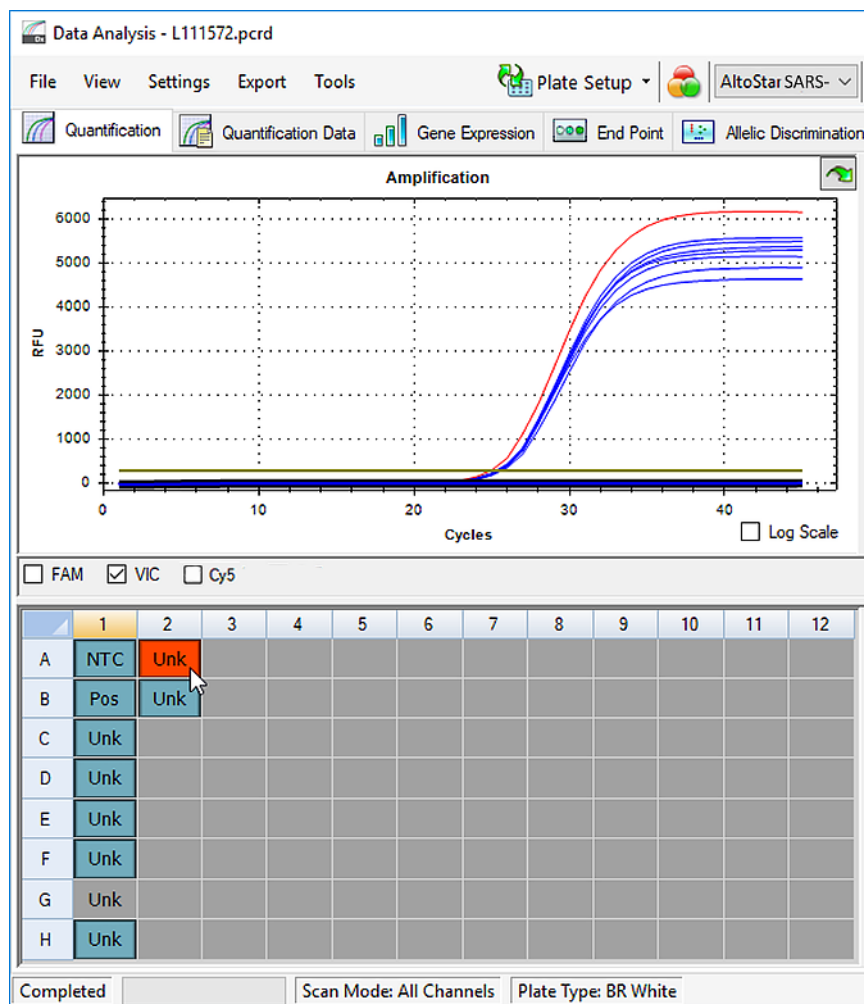


Figura 11: Janela Data Analysis (Análise de Dados): poço inválido

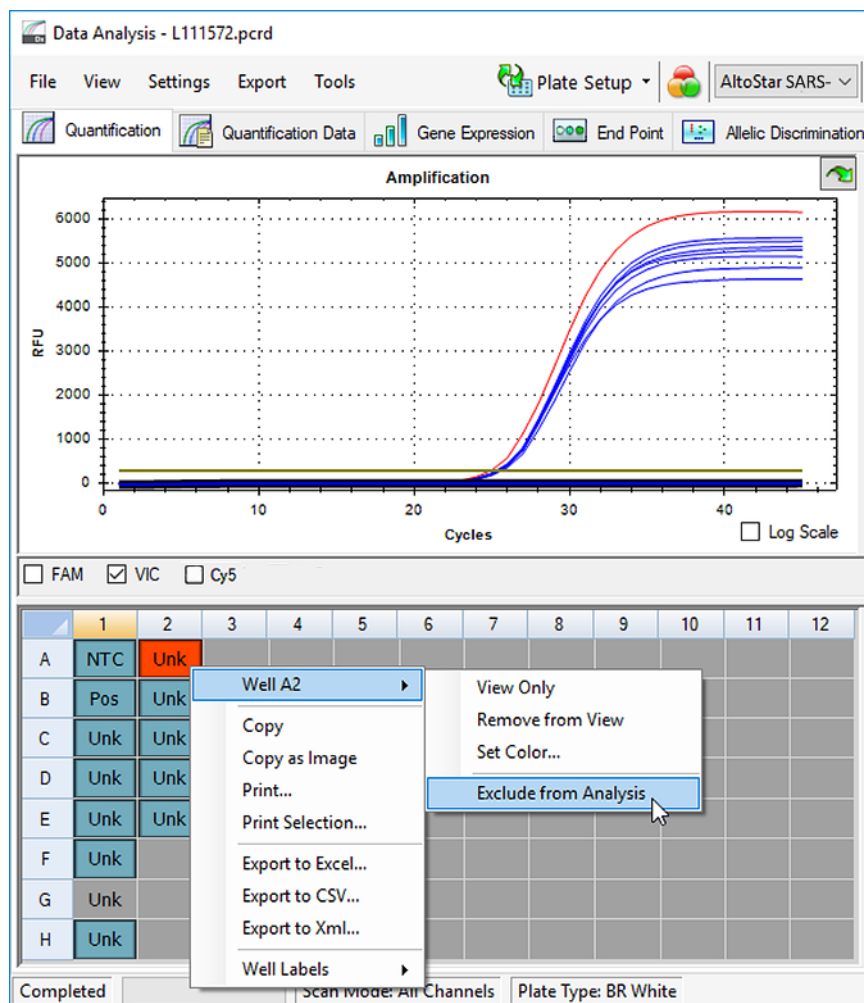


Figura 12: Janela Data Analysis (Análise de Dados): excluir poço inválido da análise

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™ (gene E)	Cy5 (gene S)	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 nos canais de deteção VIC™ (IC), FAM™ (gene E) e Cy5 (gene S) 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™ (gene E)	Cy5 (gene S)	VIC™ (IC)	
+	+	+/-*	Resultado válido
+	-	+/-*	Resultado válido
-	+	+/-*	Resultado válido
-	-	+	Resultado válido
-	-	-	Resultado inválido

* A detecção do IC não é necessária quando o gene E e/ou o gene S é detetado. Uma carga elevada de ARN do gene E e/ou gene S na amostra pode causar a redução ou ausência do sinal de IC.

7.6.9 Exportação de resultados PCR para a interpretação automatizada de resultados

Para tornar os resultados do processamento PCR disponíveis para um LIMS ligado para efeitos de interpretação automatizada de resultados, é necessário exportá-los sob a forma de 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® SARS-CoV-2 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 7.6.7.1 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® SARS-CoV-2 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**i**

A integração LIMS tem de ser implementada de acordo com as especificações da Altona Diagnostics. Para informações relativas à integração LIMS, consulte o capítulo 16. 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**i**

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 automática de resultados, 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® SARS-CoV-2 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 a caixa de verificação **VIC** e as caixas de verificação **FAM** e **Cy5**.
3. Certifique-se de que todos os passos do processo de análise (consulte os capítulos 7.6.7.1 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® SARS-CoV-2 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):

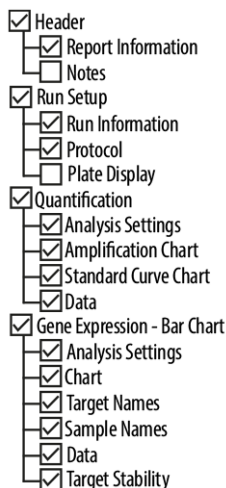


Figura 13: Caixa de diálogo Report (Relatório)

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® SARS-CoV-2 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 3 linhas para cada **Sample** (Amostra) – uma para o **Target** (Alvo) *E gene* e *S gene* 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	Cy5	S gene	NTC	NTC 131119012004	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	
B01	Cy5	S gene	Pos Ctrl	SARS-CoV-2 PC 131119012004	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	29.25	29.25	0.000	
B02	Cy5	S gene	Unkn	Sample 8 00000008	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
C01	Cy5	S gene	Unkn	Sample 1 00000001	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
D01	Cy5	S gene	Unkn	Sample 2 00000002	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
E01	Cy5	S gene	Unkn	Sample 3 00000003	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
F01	Cy5	S gene	Unkn	Sample 4 00000004	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
H01	Cy5	S gene	Unkn	Sample 6 00000006	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
A01	FAM	E gene	NTC	NTC 131119012004	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	
B01	FAM	E gene	Pos Ctrl	SARS-CoV-2 PC 131119012004	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	30.07	30.07	0.000	
B02	FAM	E gene	Unkn	Sample 8 00000008	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
C01	FAM	E gene	Unkn	Sample 1 00000001	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	29.25	29.25	0.000	qualitative
D01	FAM	E gene	Unkn	Sample 2 00000002	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
E01	FAM	E gene	Unkn	Sample 3 00000003	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
F01	FAM	E gene	Unkn	Sample 4 00000004	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
H01	FAM	E gene	Unkn	Sample 6 00000006	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
A03	VIC	Internal Control	NTC	NTC 131119012004	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	24.91	24.91	0.000	
B02	VIC	Internal Control	Unkn	SARS-CoV-2 PC 131119012004	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	25.30	25.30	0.000	qualitative
C01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 1 00000001	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	25.34	25.34	0.000	qualitative
D01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 2 00000002	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	25.45	25.45	0.000	qualitative
E01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 3 00000003	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	25.27	25.27	0.000	qualitative
F01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 4 00000004	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	25.38	25.38	0.000	qualitative
H01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 6 00000006	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	25.40	25.40	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).

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

Tabela 9: Interpretação de resultados

Canal de detecção			Interpretação de resultados
FAM™ (gene E)	Cy5 (gene S)	VIC™ (IC)	
+	+	+ ⁶⁾	Detetado ARN específico da linhagem B-βCoV e do SARS-CoV-2. Positivo para SARS-CoV-2.
+	-	+ ⁶⁾	Detetado apenas ARN específico da linhagem B-βCoV. Presumível positivo para SARS-CoV-2. ^{7),8)}
-	+	+ ⁶⁾	Detetado apenas ARN específico do SARS-CoV-2. Positivo para SARS-CoV-2. ⁷⁾
-	-	+	Não foi detetado ARN específico da linhagem B-βCoV nem do SARS-CoV-2. A amostra não contém quantidades detetáveis do ARN específico do SARS-CoV-2.
-	-	-	Inibição de RT-PCR ou falha do reagente. Repetir teste a partir da amostra original ou recolher e testar uma nova amostra.

⁶⁾ Não é necessária a detecção do IC no canal de detecção VIC™ para resultados positivos no canal de detecção FAM™ ou no canal de detecção Cy5. Uma carga elevada de ARN de linhagem B-βCoV (gene E alvo) e/ou SARS-CoV-2 (gene S alvo) na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Internal Control (controlo interno).

⁷⁾ A detecção em apenas um dos dois canais de detecção respetivos para o gene E e o gene S poderá dever-se a uma baixa concentração do ARN viral próxima do limite de detecção ou devido a mutação de uma das duas sequências alvo.

⁸⁾ A amostra poderá voltar a ser testada repetindo a extração e a RT-PCR. Se o resultado repetido se mantiver presumivelmente positivo, poder-se-ão realizar outros testes de confirmação.

8. Utilizar o kit AltoStar® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 foi validado com outros instrumentos PCR em tempo real (consulte o capítulo 5.3.2.2 Instrumentos PCR em tempo real). Os capítulos seguintes 8.1 Materiais e dispositivos necessários mas não fornecidos e 8.2 Procedimento descrevem como utilizar o kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 com estes instrumentos.

8.1 Materiais e dispositivos necessários mas não fornecidos

Os seguintes instrumentos e materiais são necessários:

- Materiais e dispositivos gerais (consulte o capítulo 7.5 Materiais e dispositivos gerais)
- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)
 - PCR plates (placas PCR) com 96 poços e película de selagem (para mais pormenores, consulte a tabela 2)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
 - PCR plates (placas PCR) com 96 poços e película de selagem (para mais pormenores, consulte a tabela 2)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
 - Tubos de 0,1 ml em tiras e tampas [STRIP Tubes 0.1ml (Tubos em TIRAS 0,1 ml) para cicladores Rotor-Gene® (LTF Labortechnik) ou equivalente]
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System e ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
 - PCR plates (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 (Roche)
 - PCR plates (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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 foi validado utilizando o AltoStar® AM16 em combinação com o kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

Os seguintes kits e sistemas alternativos de extração de ácido nucleico também podem ser adequados. A adequação do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com o kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 deve ser validada pelo utilizador.

O kit AltoStar® SARS-CoV-2 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 PCR seguinte.

- Ao utilizar outros métodos para a extração de ácido nucleico que não sejam o AltoStar® AM16 em combinação com o kit AltoStar® Purification Kit 1.5, o IC tem de ser adicionado durante o passo de lise do procedimento de extração de ácido nucleico.
- O IC deve ser sempre adicionado à mistura de amostra/lysis buffer (tampão de lise).
- O volume do IC que deve ser adicionado depende sempre e apenas do volume da eluição. Este representa 50 % do volume da eluição. Por exemplo, se o ácido nucleico vai ser eluído em 60 µl de tampão de eluição ou água, deve ser adicionado 30 µl de IC por amostra à mistura de amostra/lysis buffer (tampão de lise).

ATENÇÃO

O armazenamento de eluatos nas condições erradas poderá provocar a degradação da sequência-alvo do SARS-CoV-2, o que poderia comprometer o desempenho do produto.

8.2.2 Preparação da master mix

Todos os componentes do kit AltoStar® SARS-CoV-2 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 PCR plate (placa PCR) ótica com 96 poços adequada ou um tubo de reação ótico adequado.

- 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

- Certifique-se de que pelo menos 1 PC e 1 NTC é utilizado por processamento.
- Misture cuidadosamente as amostras e os controlos com a master mix através de pipetagem para cima e para baixo.
- Feche a PCR plate (placa PCR) com 96 poços com uma PCR Plate Sealing Foil (película de selagem da placa PCR) e os tubos de reação com tampas adequadas (consulte o capítulo 8.1 Materiais e dispositivos necessários mas não fornecidos).
- Centrifugue a PCR plate (placa PCR) com 96 poços numa centrífugadora com rotor para placas de microtitulação durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~ 3000 rpm).

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® SARS-CoV-2 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
Gene E	E gene	FAM™	(Nenhum)
Gene S	S gene	Cy5	(Nenhum)
Internal control (controlo interno)	IC	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: seg]
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® SARS-CoV-2 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 DIV 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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 foi avaliado utilizando um sobrenadante de cultura de células do SARS-CoV-2 inativado por calor (*BetaCoV/Munich/ChVir984/2020* fornecido pelo Instituto de Virologia, Charité Berlim; Alemanha).

9.1 Esfregaços respiratórios

9.1.1 Sensibilidade analítica

Para a determinação do limite de deteção (LDD), foi gerada uma série de diluições de sobrenadante de cultura de células do SARS-CoV-2 inativado por calor (*BetaCoV/Munich/ChVir984/2020* fornecido pelo Instituto de Virologia, Charité Berlim; Alemanha) diluído em Universal Transport Medium™ (UTM®, Copan) contendo matriz nasal simulada [5 % p/v mucina, 5 % v/v sangue, 0,8 % v/v NaCl (95 % solução salina) e 0,00002 % p/v ADN genómico humano (510k Submissão para ensaio BD MAX™ MRSA XT; número de registo: K133605)] entre 1,00E+00 e 1,00E-04 UFP/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® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 para o gene E

Concentração [UFP/ml]	N [total]	N [positivo]	Taxa de positividade [%]
1,00E+00	24	24	100
3,16E-01	24	24	100
1,00E-01	24	24	100
3,16E-02	24	24	100
1,00E-02	24	21	88
3,16E-03	24	12	50
1,00E-03	24	4	17
3,16E-04	24	1	4
1,00E-04	24	2	8

O LDD do kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 para a deteção de SARS-CoV-2 no UTM® é de 0,025 UFP/ml (intervalo de confiança de 95 %: 0,014–0,060 UFP/ml).

Tabela 16: Resultados PCR utilizados para calcular a sensibilidade analítica do kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 para o gene S

Concentração [UFP/ml]	N [total]	N [positivo]	Taxa de positividade [%]
1,00E+00	24	24	100
3,16E-01	24	24	100
1,00E-01	24	24	100
3,16E-02	24	24	100
1,00E-02	24	23	96
3,16E-03	24	15	63
1,00E-03	24	4	17
3,16E-04	24	2	8
1,00E-04	24	1	4

O LDD do kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 para a detecção de SARS-CoV-2 no UTM® é de 0,014 UFP/ml (intervalo de confiança de 95 %: 0,008–0,032 UFP/ml).

9.1.2 Especificidade analítica

A especificidade analítica do kit AltoStar® SARS-CoV-2 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 SARS-CoV-2 relevantes serão detetados.

Para verificação da especificidade analítica do kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5, foram realizados os seguintes ensaios (consulte os capítulos 9.1.2.1 Amostras negativas a 9.1.2.4 Reatividade cruzada).

9.1.2.1 Amostras negativas

Foram testadas 35 amostras negativas de esfregaços respiratórios para o SARS-CoV-2 de doadores individuais com o kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5. Todas as amostras testadas (35 de 35) mostraram resultados negativos para o ARN específico do SARS-CoV-2 e positivos para o IC. A especificidade analítica do kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 para amostras de esfregaços respiratórios é $\geq 95\%$.

9.1.2.2 Substâncias interferentes

Para avaliar a influência de substâncias exógenas potencialmente interferentes no desempenho do kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5, foram fortificadas substâncias selecionadas em UTM® contendo matriz nasal simulada. Essas amostras de continham SARS-CoV-2 numa concentração de 3 x LDD (0,075 UFP/ml) e nenhum SARS-CoV-2, respectivamente.

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

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

- Substâncias exógenas
 - Spray nasal descongestionante: cloridrato de xilometazolina e dexpantenol (nasic® Nasenspray)
 - Spray nasal antialérgico: dipropionato de beclometasona (ratioAllerg® Heuschnupfenspray)

ATENÇÃO



A presença de inibidores de PCR poderia causar resultados inválidos ou falsos negativos.

9.1.2.3 Inclusividade

Foi avaliada a inclusividade do kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 para isolados diferentes de SARS-CoV-2 através de testes molhados ou análise *in silico*. Os resultados são apresentados nas tabelas 17 e 18.

Tabela 17: Inclusividade (testes molhados) AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5

SARS-CoV-2 estirpe/isolado	Fonte/tipo de amostra	Concentração
<i>BetaCoV/Munich/ ChVir984/2020*</i>	Instituto de Virologia; Charité Berlim; Alemanha/ Sobrenadante de cultura de células inativado por calor	1,00E+04 cópias/μl
2019-nCoV/Italy-INMI1	European Virus Archive Global/ARN	1,00E+06 cópias/μl

* A estirpe *BetaCoV/Munich/ChVir984/2020* foi utilizada para a determinação do LDD do AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5

Tabela 18: Inclusividade [análise *in silico* para 2 993 884 sequências de genoma inteiro do SARS-CoV-2 publicadas através da GISAID e.V. (www.gisaid.org) em 10 de outubro de 2021 e 518 615 sequências de genoma inteiro publicadas através do National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) em 10 de outubro de 2021 para o alvo do gene E e do gene S: AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5]

3 512 499 sequências de genoma inteiro		Sequências que apresentam 100 % de homologia	Sequências que apresentam mismatches (número de mismatches)
Gene E	Primer forward	3 505 942	6 549 (1) 8 (2)
	Primer reverse	3 509 461	3 032 (1) 5 (2) 1 (3)**
	Sonda	3 510 308	2 183 (1) 4 (2)

3 512 499 sequências de genoma inteiro		Sequências que apresentam 100 % de homologia	Sequências que apresentam mismatches (número de mismatches)
Gene S	Primer forward	3 491 594	20 728 (1)
			160 (2)
	Primer reverse	3 490 361	22 061 (1)
			77 (2)
	Sonda	3 498 798	13 653 (1)
			44 (2)
3 (3)			
1 (4)*			

* A sequência (registro ID EPI_ISL_415593, GISAID) apresentou 4 mismatches no local de ligação da sonda do gene S. Esta sequência foi publicada a 10 de março de 2020 com origem em Washington, EUA. Desde então, nenhuma das sequências publicadas apresentou novamente esse número de mismatches. A sequência foi comentada pelos autores, "Atenção. Sequências de NNN (1,74 % da sequência geral)", indicando que a qualidade da sequenciação não era ideal, pelo que o impacto nos oligonucleotídeos específicos do gene S não foi investigado.

**A sequência (registro MW584978.1) apresentou 3 mismatches no local de ligação do primer reverse do gene E. Esta amostra foi colhida a 3 de abril de 2020 e publicada em fevereiro de 2021 com origem em Cleveland, EUA. Desde então, nenhuma das sequências publicadas apresentou novamente esse número de mismatches.

Dependendo da posição, é pouco provável que eventos de mutação conducentes a ≤ 2 mismatches numa única sequência de oligonucleotídeos tenham qualquer efeito negativo significativo no desempenho do ensaio. Todas essas sequências (≤ 2 mismatches) testadas em ensaios laboratoriais molhados no caso das atividades de vigilância pós-introdução no mercado relativas aos kits RealStar®, FlexStar® e AltoStar® para detecção de SARS-CoV-2 confirmaram, até agora, que o desempenho não foi afetado por essas mutações. À exceção de uma única sequência, nenhuma das outras sequências analisadas apresentou mismatches em mais de um oligonucleotídeo e nenhuma das sequências desemparelhadas apresentou mismatches com ambos os sistemas de detecção específicos (gene E e gene S), pelo que não se prevê que a reatividade dos oligonucleotídeos específicos incluídos nos kits RealStar®, FlexStar® e AltoStar® kits para detecção de SARS-CoV-2 seja afetada.

9.1.2.4 Reatividade cruzada

A especificidade analítica do kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 no que respeita à reatividade cruzada com outros agentes patogénicos que não o SARS-CoV-2 foi avaliada testando:

- Agentes patogénicos relacionados com o SARS-CoV-2
- Agentes patogénicos que provocam sintomas semelhantes a uma infeção com SARS-CoV-2
- Agentes patogénicos que se encontram provavelmente presentes em pacientes que têm uma infeção com SARS-CoV-2

Com exceção do SARS-coronavírus*, o kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 não reagiu com qualquer um dos seguintes agentes patogénicos:

- | | |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| • Adenovírus | • MERS-coronavírus |
| • <i>Bordetella pertussis</i> | • <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| • <i>Candida albicans</i> | • <i>Mycoplasma pneumoniae</i> |
| • <i>Chlamydia pneumoniae</i> | • Vírus Parainfluenza 1-4 |
| • Enterovírus | • <i>Pneumocystis jirovecii</i> |
| • <i>Haemophilus influenzae</i> | • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| • Coronavírus humano 229E | • Vírus sincicial respiratório A |
| • Coronavírus humano NL63 | • Vírus sincicial respiratório B |
| • Coronavírus humano OC43 | • Rinovírus |
| • Metapneumovírus humano (hMPV) | • <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| • Vírus da Gripe A | • <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| • Vírus da Gripe B | • <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| • <i>Legionella pneumophila</i> | • <i>Streptococcus salivarius</i> |

* Obtém-se um resultado positivo para o SARS-coronavírus com o kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 no canal FAM™, uma vez que o alvo do gene E não é específico do SARS-CoV-2, mas deteta todos os betacoronavírus de linhagem B, incluindo o SARS-coronavírus.

ATENÇÃO



No caso de a amostra conter outros agentes patogénicos que não o SARS-CoV-2, poderá haver concorrência com a amplificação alvo ou reatividades cruzadas, causando resultados de exames DIV incorretos.

9.1.3 Precisão

A precisão do kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 foi avaliada utilizando um painel constituído por:

- 1 amostra altamente positiva de SARS-CoV-2 [1,25 UFP/ml (50 x LDD)] em UTM®
- 1 amostra fracamente positiva de SARS-CoV-2 [0,075 UFP/ml (3 x LDD)] em UTM®
- 1 amostra de UTM® negativa de SARS-CoV-2

Cada componente do painel foi testado em pelo menos 4 réplicas por processamento.

Foram realizados 5 processamentos em 5 dias diferentes utilizando combinações de:

- 3 lotes de kit AltoStar® SARS-CoV-2 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

A repetibilidade (variabilidade intraprocessamento), a variabilidade entre lotes e a reprodutibilidade (variabilidade total) foram determinadas com base em:

- Valores do ciclo limiar (C_q^*) para as amostras altamente positivas de SARS-CoV-2 (consulte a tabela 19)
- Valores do ciclo limiar (C_q^*) para o IC nas amostras negativas de SARS-CoV-2 (consulte a tabela 20)

* 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).

Tabela 19: Dados de precisão (CV % valores C_q) para amostras de UTM® altamente positivas de SARS-CoV-2

	Amostra altamente positiva de SARS-CoV-2 (C_q no canal FAM™, gene E alvo)	Amostra altamente positiva de SARS-CoV-2 (C_q no canal Cy5, gene S alvo)
Variabilidade intraprocessamento	0,15–0,61	0,02–0,34
Variabilidade entre lotes	0,44	0,41
Variabilidade total	1,83	1,22

Todas as amostras testadas a 3 x LDD (amostras fracamente positivas) foram detetadas como positivas para o SARS-CoV-2 (gene E e gene S).

Tabela 20: Dados de precisão (CV % valores C_q) para o IC em amostras de UTM® negativas de SARS-CoV-2

	IC
Variabilidade intraprocessamento	0,12–0,49
Variabilidade entre lotes	0,39
Variabilidade total	1,02

9.1.4 Taxa de insucesso total

A solidez do kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 foi avaliada através do teste de 35 amostras de esfregaços respiratórios humanos negativas de SARS-CoV-2, de dadores individuais, fortificadas com SARS-CoV-2 para uma concentração final de 3 x LDD (0,075 UFP/ml). Todas as amostras testadas (35 de 35) mostraram resultados positivos nos canais de detecção por fluorescência específicos do SARS-CoV-2 (FAM™ e Cy5, respetivamente).

9.1.5 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; 2 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.

9.1.6 Desempenho clínico

O kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 foi avaliado num estudo comparativo com o Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit (Anatolia Geneworks) com marcação CE. Foram testadas retrospectivamente em paralelo 110 amostras de esfregaços respiratórios utilizando o Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit (Anatolia Geneworks) e o kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5.

O Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit (Anatolia Geneworks) foi utilizado em combinação com o *m*Sample Preparation Systems RNA (Abbott) e o *m*2000sp Instrument (Abbott).

O kit AltoStar® SARS-CoV-2 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 104 amostras restantes são apresentados na tabela 21.

Tabela 21: Resultados da avaliação da sensibilidade e da especificidade de diagnóstico para o SARS-CoV-2 em amostras de esfregaços respiratórios

		Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit (Anatolia Geneworks)	
		POSITIVO	NEGATIVO
AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	POSITIVO	51	2
	NEGATIVO	0	51

A sensibilidade e a especificidade de diagnóstico do kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 em comparação com o Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit (Anatolia Geneworks) foram de 100 % e 96 %, 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 PCR plate (placa PCR) tem de ser eliminada selada uma vez que a PCR Plate Sealing Foil (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® SARS-CoV-2 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. Bibliografia

- [1] Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10ª edição. ASM Press, 2011.
- [2] Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Terceira edição. Mosby, 2010.

14. Marcas comerciais e isenções de responsabilidade

4s3™ (4titude); AltoStar® (altona Diagnostics); ABI Prism®, QuantStudio™ (Applied Biosystems); BD MAX™ (BD); CFX96™, CFX Manager™ (Bio-Rad); Universal Transport Medium™, UTM® (Copan); nasic® (Klosterfrau Healthcare Group); Rotor-Gene® (QIAGEN); ratioAllerg® (ratiopharm); LOINC® (Regenstrief Institute, Inc.); LightCycler® (Roche); FAM™, JOE™, MicroAmp™, ROX™, 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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 é um kit de diagnóstico com a marcação CE, de acordo com a Diretiva Europeia 98/79/CE relativa ao diagnóstico *in vitro*.



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

Não disponível em todos os países.

© 2021 altona Diagnostics GmbH. Todos os direitos reservados.

15. Símbolos

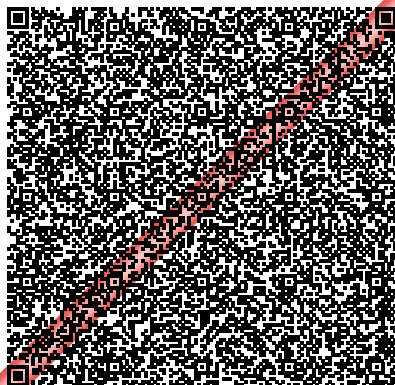
Símbolo	Explicação
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Número de item de comércio internacional
	Código do lote
	Conteúdo
	Cor da tampa
	Número de catálogo
	Número
	Componente
	Consulte as instruções de utilização
	Contém o suficiente para «n» testes/reações (rxns)
	Limite de temperatura
	Data de validade
	Fabricante
	Atenção
	Número de material
	Versão

Símbolo	Explicação
	Nota
	Contém material biológico de origem animal

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

O código de barras 2D na figura 15 deve ser utilizado para instalar o protocolo de ensaio mais recente para utilização do kit AltoStar® SARS-CoV-2 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 23.

AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5



Protocol Version:

Checksum: 5687248E75F8BFED894A31601106219CB09EDEFD

1

Figura 15: Código de barras do protocolo de ensaio do kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5

Tabela 22: Registo de alterações para o protocolo de ensaio

Versão do protocolo	Atualizações dos lançamentos
1	Versão inicial

Tabela 23: Informação para a integração LIMS

Utilização	Dados
Ordem do teste (LIMS → AltoStar® AM16)	AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5
Resultado do teste (CFX96™ DW Dx → LIMS) unidade	N/A
Resultado do teste (CFX96™ DW Dx → LIMS) canal 1	E gene
Resultado do teste (CFX96™ DW Dx → LIMS) canal 2	Internal Control
Resultado do teste (CFX96™ DW Dx → LIMS) canal 4	S gene

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).

17. Histórico de revisões

Tabela 24: Histórico de revisões

Identificador	Data de emissão [mês/ano]	Modificações
MAN-AS0821547-PT-S01	10/2021	Lançamento inicial

página deixada intencionalmente em branco

página deixada intencionalmente em branco

página deixada intencionalmente em branco

always a drop ahead.

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

