altona DIAGNOSTICS

Instrucțiuni de utilizare

AltoStar®
Adenovirus PCR Kit 1.5

12/2025 RO

AltoStar®

AltoStar®

Adenovirus PCR Kit 1.5

Pentru utilizare cu

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)

CFX96™ Dx System (Bio-Rad)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

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

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

CE 0483

IVD

REF AS0301543

Σ 96

12 2025

altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12
22767 Hamburg • Germany

MAN-AS0301540-RO-S01

Cuprins

1. Despre aceste instrucțiuni de utilizare 8

2. Utilizare prevăzută 9

3. Componentele setului 9

3.1 Reactivi 10

3.2 Pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 11

4. Depozitare și manevrare 11

4.1 Depozitare 11

4.2 Manevrare 12

4.2.1 Master A și Master B 13

4.2.2 Standardele de cuantificare și No Template Control (Control fără șablon) 13

5. Descrierea produsului 13

5.1 Informații generale 14

5.2 Descrierea reactivului 15

5.2.1 Master A și Master B 15

5.2.2 Standarde de cuantificare 15

5.2.3 No Template Control (Control fără șablon) 16

5.3 Fluxuri de lucru 16

5.3.1 AltoStar® Workflow (flux de lucru) 16

5.3.2 Alte fluxuri de lucru 17

5.4 Probe 18

5.4.1 Tipuri de probe 18

5.4.2 Colectarea și manipularea probelor 18

6. Avertismente, măsuri de precauție și limitări 19

7. Utilizarea setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 cu AltoStar® Workflow (flux de lucru) 21

7.1 Volumul probei 22
7.2 Tuburi pentru probe 22
7.3 Codurile de bare ale probelor 22
7.4 Materiale și dispozitivele necesare, dar care nu sunt furnizate pentru fluxul de lucru AltoStar® Workflow 23
7.5 Materiale și dispozitive generale 24
7.6 Procedură 25
7.6.1 Prezentare generală pentru AltoStar® Workflow (flux de lucru) 25
7.6.2 Programarea unui ciclu AltoStar® 31
7.6.3 Pornirea unui ciclu de configurare PCR 31
7.6.3.1 Pregătirea reactivilor pentru un ciclu de configurare PCR 32
7.6.3.2 Încărcarea sistemului de automatizare AltoStar® AM16 pentru un ciclu de configurare PCR 33
7.6.3.3 În timpul ciclului de configurare PCR 37
7.6.4 Sfârșitul ciclului de configurare PCR 37
7.6.4.1 Rezultatele ciclului de configurare PCR 38
7.6.5 Sigilarea plăcii PCR 40
7.6.5.1 Stabilitatea amestecului PCR 41
7.6.6 Pornirea unui ciclu PCR 42
7.6.6.1 În timpul ciclului PCR 43
7.6.7 Analiza datelor PCR utilizând software-ul CFX Manager™ Dx 43
7.6.7.1 Atribuirea testelor la grupuri de godeuri 45
7.6.7.2 Corecție de referință 48
7.6.7.3 Excluderea semnalelor PCR neregulate 50
7.6.7.4 Setarea pragurilor 54
7.6.8 Validitatea rezultatelor PCR 58
7.6.8.1 Excluderea godeurilor care conțin date invalide 58
7.6.8.2 Validitatea unui ciclu PCR diagnostic (calitativ) 61
7.6.8.3 Validitatea unui ciclu PCR diagnostic (cantitativ) 61

7.6.8.4 Validitatea rezultatelor pentru o probă 63
7.6.9 Exportul rezultatelor PCR pentru interpretarea realizată de LIMS 63
7.6.10 Exportul rezultatelor PCR pentru interpretarea manuală a rezultatelor 64
7.6.10.1 Interpretarea manuală a rezultatelor 66
7.6.11 Analiza datelor PCR și interpretarea automată a rezultatelor utilizând software-ul FastFinder Standalone 68

8. Utilizarea setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 cu instrumente PCR în timp real diferite de CFX96™ Deep Well Dx System 69
8.1 Materiale și dispozitive necesare, dar care nu sunt furnizate 70
8.2 Procedură 71
8.2.1 Pregătirea probei 71
8.2.2 Configurarea amestecului master mix 71
8.2.3 Configurarea reacției 72
8.2.4 Ciclu PCR 73
8.2.4.1 Programarea instrumentului PCR în timp real 73
8.2.4.2 Setări ciclu 74
8.2.5 Analiza datelor 75

9. Date de performanță 76
9.1 Plasmă 76
9.1.1 Sensibilitate analitică 76
9.1.2 Specificitate analitică 78
9.1.2.1 Probe negative 78
9.1.2.2 Substanțe interferente 78
9.1.2.3 Reactivitate încrucișată 79
9.1.3 Reactivitate 80
9.1.4 Interval liniar 81
9.1.5 Precizie 82
9.1.6 Rată totală de eșec 86

9.1.7 Transfer 86
9.1.8 Performanță clinică 87
9.2 Sânge integral 89
9.2.1 Sensibilitate analitică 89
9.2.2 Specificitate analitică 90
9.2.2.1 Probe negative 90
9.2.2.2 Substanțe interferente 90
9.2.2.3 Reactivitate încrucișată 91
9.2.3 Reactivitate 91
9.2.4 Interval liniar 92
9.2.5 Precizie 93
9.2.6 Rată totală de eșec 97
9.2.7 Transfer 97
9.2.8 Performanță clinică 97

10. Depozitare 99

11. Controlul calității 100

12. Asistență tehnică 100

13. Rezumat privind siguranța și performanța 101

14. Literatura de specialitate 101

15. Mărcile comerciale și declinările de răspundere 101

16. Simboluri 102

17. Protocol de testare pentru AltoStar® Connect software și informații pentru integrarea în LIMS 104

18. Istoricul revizuirilor 105

1. Despre aceste instrucțiuni de utilizare

Aceste instrucțiuni de utilizare oferă utilizatorului îndrumări privind operarea setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5. Capitolele 1-6 și 9-14 conțin informații generale și instrucțiuni aplicabile tuturor fluxurilor de lucru utilizate cu setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5. Capitolul 7 oferă instrucțiuni privind utilizarea produsului: cu sistemul de automatizare AltoStar® Automation System AM16 (Hamilton; denumit în continuare AltoStar® AM16) împreună cu AltoStar® Connect software (versiunea 1.7.4 sau superioară, Hamilton) pentru configurarea automată a PCR; și pe sistemul CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad; denumit în continuare CFX96™ DW Dx) împreună cu software-ul CFX Manager™ Dx Software (versiunea 3.1, Bio-Rad) pentru PCR în timp real. Capitolul 8 conține instrucțiuni privind utilizarea setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 împreună cu alte instrumente PCR în timp real. Pentru detalii privind utilizarea sistemului de automatizare AltoStar® AM16, a software-ului AltoStar® Connect Software, a setului AltoStar® Purification Kit 1.5, a setului AltoStar® Internal Control 1.5 și a sistemului CFX96™ DW Dx, consultați instrucțiunile de utilizare corespunzătoare enumerate mai jos:

- Manual de utilizare IVD al AltoStar® Automation System AM16 (Hamilton)
- Manual IVD al AltoStar® Connect Software (Hamilton)
- Instrucțiuni de utilizare pentru AltoStar® Purification Kit 1.5
- Instrucțiuni de utilizare pentru AltoStar® Internal Control 1.5
- Manual de utilizare pentru sistemele CFX96™ Dx și CFX96™ Deep Well Dx (Bio-Rad)

Pe parcursul acestui manual, termenii ATENȚIE și NOTĂ au următoarele semnificații:

ATENȚIE

Evidențiază instrucțiuni sau proceduri de operare care, dacă nu sunt urmate corect, pot duce la vătămări corporale sau pot afecta performanța produsului. Contactați asistența tehnică altona Diagnostics pentru ajutor.

NOTĂ

Informații furnizate utilizatorului care sunt utile, dar nu esențiale, pentru sarcina în cauză.

Citiți cu atenție instrucțiunile de utilizare înainte de a utiliza produsul.

2. Utilizare prevăzută

Setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 este un test de diagnostic *in vitro*, bazat pe tehnologia PCR în timp real, pentru detectarea și cuantificarea ADN specific pentru adenovirus uman (HAdV) în plasmă umană cu EDTA și citrat și în sânge integral uman cu EDTA și citrat.

Este destinat utilizării ca instrument auxiliar pentru diagnosticarea infecției cu HAdV și pentru monitorizarea încărcăturii virale de HAdV la persoanele infectate cu HAdV.

Rezultatele obținute cu setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 trebuie interpretate împreună cu celelalte rezultate clinice și de laborator.

Setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 este destinat pentru a fi utilizat de către utilizatori profesioniști instruiți în tehnici de biologie moleculară și proceduri de diagnostic *in vitro*.

3. Componentele setului

Setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 include o cutie cu reactivi și pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5.

3.1 Reactivi

Setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 conține următoarele componente:

Tabelul 1: Componentele setului

Culoarea capacului	Componentă	Număr de tub	Volum nominal [µl/tub]
Albastru	Master A[1)]	8	60[2)]
Violet	Master B[1)]	8	180[3)]
Roșu	QS1[4)]	2	250
Roșu	QS2[4)]	2	250
Roșu	QS3[4)]	2	250
Roșu	QS4[4)]	2	250
Alb	NTC[5)]	2	250

[1)] Conține material biologic de origine animală

[2)] Conține un volum suplimentar de 25 µl pentru a compensa volumul mort la manipularea lichidelor sistemului de automatizare AltoStar® AM16

[3)] Conține un volum suplimentar de 55 µl pentru a compensa volumul mort la manipularea lichidelor sistemului de automatizare AltoStar® AM16

[4)] Standard de cuantificare (control pozitiv)

[5)] No Template Control (control negativ)

ATENȚIE

Înainte de prima utilizare, verificați integritatea produsului și a componentelor sale în ceea ce privește numărul, tipul și nivelul predefinit de umplere. Nu utilizați un produs defect sau incomplet; performanța produsului poate fi afectată.

Setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 conține suficienți reactivi pentru a efectua 96 reacții într-un număr maxim de 8 de teste.

Produsul este expediat pe gheață carbonică. La primire și înainte de prima utilizare, verificați produsul și componentele acestuia pentru:

- Integritate
- Completitudine în ceea ce privește numărul, tipul și nivelul de umplere
- Etichetare corectă
- Data de expirare
- Starea congelată
- Claritate și absența particulelor

Dacă unul sau mai multe componente ale produsului nu sunt congelate la primire sau dacă tuburile au fost deteriorate în timpul transportului sau lipsesc, contactați asistența tehnică altona Diagnostics pentru ajutor (consultați capitolul 12. Asistență tehnică).

3.2 Pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5

Pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5, versiunea 2.0, poate fi utilizat opțional în combinație cu software-ul FastFinder Standalone pentru analiza datelor și interpretarea automată a rezultatelor. Acesta nu este furnizat împreună cu reactivii setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 și trebuie comandat separat, ca parte a AltoStar® Automated Analysis Package (nr. comandă VK000045).

4. Depozitare și manevrare

Toți reactivii incluși în setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 sunt soluții gata de utilizare.

4.1 Depozitare

Toți reactivii din setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 trebuie păstrați la -25 °C până la -15 °C imediat după primire.

ATENȚIE

Condițiile de depozitare necorespunzătoare ar putea compromite performanța produsului.

ATENȚIE

Nu utilizați produsele după data de expirare. Utilizarea produselor expirate ar putea compromite performanța produsului.

4.2 Manevrare

ATENȚIE

Nu depășiți durata secvenței de decongelare-congelare și durata de manevrare specificate în aceste instrucțiuni de utilizare, deoarece acest lucru ar putea compromite performanța produsului.

ATENȚIE

Manevrarea necorespunzătoare a componentelor produsului și a probelor poate cauza contaminarea și ar putea compromite performanța produsului:

- Nu schimbați capacele fiolelor sau ale flacoanelor.
- Depozitați materialele pozitive și/sau potențial pozitive separat de componentele setului.
- Utilizați zone de lucru separate pentru pregătirea probelor/ configurarea reacției și pentru activitățile de amplificare/detecție.
- Aruncați întotdeauna mănușile după manevrarea materialelor pozitive și/sau potențial pozitive.
- Nu deschideți plăcile PCR și/sau tuburile după amplificare.

ATENȚIE

Nu amestecați componente din loturi diferite ale setului. Utilizarea loturilor diferite poate compromite performanța produsului.

4.2.1 Master A și Master B

După decongelare, Master A și Master B sunt stabili timp de 5 ore la temperaturi de până la +30 °C.

NOTĂ

Dacă Master A și Master B au fost decongelați, dar nu au fost utilizați, pot fi recongelați și decongelați o singură dată pentru cicluri ulterioare. Dacă sunt deschise, aruncați capacele și folosiți capace noi pentru a evita contaminarea reactivilor.

4.2.2 Standardele de cuantificare și No Template Control (Control fără șablon)

1. După decongelare, standardele de cuantificare (QS) și No Template Control (Control fără șablon, NTC) sunt stabile timp de 5 ore la temperaturi de până la +30 °C.
2. Aruncați capacele tuburilor QS și NTC la fiecare utilizare și folosiți capace noi pentru a evita contaminarea reactivilor.
3. După utilizare, închideți tubutile QS și NTC cu capace noi și congelați-le imediat.
4. Nu depășiți următoarea secvență de decongelare-congelare pentru fiecare tub QS și NTC: *Decongelare 1* → *Congelare 1* → *Decongelare 2* → *Congelare 2* → *Decongelare 3* → *Congelare 3* → *Decongelare 4*

5. Descrierea produsului

Setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 este un test de diagnostic *in vitro* pentru detectarea și cuantificarea ADN specific pentru HAdV în plasmă umană cu EDTA și citrat și în sânge integral uman cu EDTA și citrat.

Se bazează pe tehnologia PCR în timp real, utilizând reacția de polimerizare în lanț (PCR) pentru amplificarea secvențelor target de HAdV specific și sonde specifice target, marcate fluorescent, pentru detectarea ADN-ului amplificat.

În plus față de sistemul de amplificare și detecție a ADN specific pentru HAdV, care vizează gena hexon a genomului viral, testul include oligonucleotide pentru amplificarea și detecția controlului intern (abreviat în continuare IC; AltoStar® Internal Control 1.5).

Sondele specifice pentru ADN HAdV sunt etichetate cu fluoroforul FAM™. Sondele specifice pentru IC sunt etichetate cu un fluorofor (JOE™) detectabil, de exemplu, în canalul VIC™.

Utilizarea sondelor asociate cu coloranți care se pot distinge permite detecția în paralel a ADN specific pentru HAdV și IC în canalele de detecție corespunzătoare ale instrumentului PCR în timp real utilizat.

5.1 Informații generale

HAdV, izolate pentru prima dată în anii 1950 din țesut adenoid explantat, sunt virusuri ADN bicatenare, neînvelite, și aparțin genului Mastadenovirus din familia *Adenoviridae*.

HAdV sunt răspândite la nivel mondial, fără un caracter sezonier al infecțiilor, și sunt clasificate în speciile A-G. Specia B este subdivizată în continuare în B1 și B2. Până în prezent au fost descrise cel puțin 57 de serotipuri diferite, încadrate în speciile A-G. Toate HAdV se transmit prin contact direct, pe cale fecal-orală și, ocazional, prin intermediul apei. HAdV cauzează o gamă largă de afecțiuni, inclusiv răceli, faringită, bronșită, pneumonie, diaree, conjunctivită (infecție oculară), febră, cistită (inflamație sau infecție a vezicii urinare), erupții cutanate și afecțiuni neurologice.

Simptomele bolii depind de tropismul tisular preferențial al virusului. De exemplu, afecțiunile respiratorii sunt cauzate frecvent de speciile B1, C sau E, conjunctivita de speciile B, D sau E, iar gastroenterita de speciile A, F sau G. Infecțiile rinichilor și ale tractului urinar sunt asociate frecvent cu specia B2.

Caracteristicile epidemiologice ale adenovirusurilor variază în funcție de tip. În timp ce unele adenovirusuri umane sunt endemice în anumite regiuni ale lumii, iar infecția este dobândită de obicei în copilărie, alte tipuri provoacă infecții sporadice

și focare ocazionale. Reactivarea infecțiilor latente la pacienții imunocompromiși, cum sunt recipienții de transplant, poate duce la o boală diseminată cu potențial letal.

HAdV sunt foarte rezistente la diferite condiții de mediu și foarte contagioase, astfel încât focarele nosocomiale de boli asociate adenovirusurilor, cum ar fi keratoconjunctivita epidemică, pot apărea cu ușurință dacă măsurile de control al infecțiilor și practicile de igienă nu sunt respectate cu atenție. În unele țări, anumite cazuri de focare de HAdV trebuie raportate obligatoriu autorităților locale [1,2].

5.2 Descrierea reactivului

5.2.1 Master A și Master B

Master A și Master B conțin toate componentele (tampon PCR, ADN polimerază, săruri de magneziu, primeri și sonde) necesare pentru a permite amplificarea mediată de PCR și detectarea țintei de HAdV specific ADN și a IC într-o singură configurație de reacție.

5.2.2 Standarde de cuantificare

QS conțin concentrații standardizate de ADN specific pentru HAdV (consultați tabelul 2). Materialul utilizat pentru QS inclus în setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 este trasabil la materialul de referință produs la nivel intern. QS sunt utilizate pentru a verifica funcționalitatea sistemului de amplificare și detecție a ADN-ului specific pentru HAdV, precum și pentru a genera o curbă standard, care permite cuantificarea ADN-ului specific pentru HAdV într-o probă.

Tabelul 2: Standarde de cuantificare

Standard de cuantificare	Concentrație [copii/µl]
QS1	1,00E+04
QS2	1,00E+03
QS3	1,00E+02
QS4	1,00E+01

5.2.3 No Template Control (Control fără șablon)

NTC nu conține HAdV specific ADN dar conține șablonul IC. NTC este utilizat drept control negativ pentru HAdV ADN specific în timp real PCR și indică posibila contaminare a Master A și Master B.

5.3 Fluxuri de lucru

5.3.1 AltoStar® Workflow (flux de lucru)

AltoStar® Workflow (flux de lucru) cuprinde următoarele produse:

- Sistem de automatizare AltoStar® Automation System AM16 (Hamilton)
- AltoStar® Connect software versiunea 1.7.4 sau o versiune superioară (Hamilton)
- Sistemul CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad) cu software-ul CFX Manager™ Dx versiunea 3.1 (Bio-Rad)
- *Opțional:* software-ul FastFinder Standalone versiunea 1.0 sau ulterioară (UgenTec NV) și pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 pentru analiza datelor și interpretarea automată a rezultatelor. Versiunea validă a pluginului de testare este specificată în capitolul 3.2 Pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5.

Fluxul de lucru include următoarele etape:

1. Programarea unui ciclu AltoStar®.
2. Ciclu de purificare pe AltoStar® AM16 utilizând setul AltoStar® Purification Kit 1.5 și AltoStar® Internal Control 1.5.
3. Ciclu de configurare PCR pe sistemul de automatizare AltoStar® AM16 utilizând setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5.
4. Ciclu PCR în timp real executat pe un CFX96™ DW Dx.

Pentru mai multe detalii despre etapele 3 și 4 ale fluxului de lucru, consultați capitolul 7. Utilizarea setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 cu AltoStar® Workflow (flux de lucru). Toate tipurile și volumele probelor specificate pentru utilizarea cu setul AltoStar® Purification Kit 1.5 pot fi prelucrate simultan pe

sistemul de automatizare AltoStar® AM16. Fiecare probă poate fi analizată cu atâtea teste PCR în timp real în paralel câte permite eluatul disponibil.

NOTĂ

Testele cu profiluri de temperatură PCR diferite sunt sortate automat în plăci PCR separate.

5.3.2 Alte fluxuri de lucru

Setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 poate fi utilizat împreună cu fluxuri de lucru compatibile. Pentru utilizarea cu setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 au fost validate următoarele instrumente și programe software pentru PCR în timp real:

- ABI Prism® 7500 SDS și 7500 Software versiunea 2.3 (Applied Biosystems)
- CFX96™ Deep Well Dx System și software-ul CFX Manager™ Dx versiunea 3.1 (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx System și software-ul CFX Manager™ Dx versiunea 3.1 (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II și software-ul LightCycler® 480 versiunea 1.5.1 (Roche)
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System și QuantStudio™ 5 Dx Software v1.0.2 (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® Q 5/6 plex Platform și software-ul Rotor-Gene® Q versiunea 2.3.1 (QIAGEN)

Atunci când se utilizează unul dintre instrumentele PCR în timp real enumerate mai sus (cu excepția CFX96™ Deep Well Dx System), configurarea reacției PCR, programarea instrumentului, precum și analiza datelor trebuie efectuate manual (pentru detalii, consultați capitolele 8.2.2 Configurarea amestecului master mix până la 8.2.5 Analiza datelor).

5.4 Probe

5.4.1 Tipuri de probe

Următoarele tipuri de probe sunt validate pentru utilizarea cu setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5:

- Plasmă umană cu EDTA
- Plasmă umană cu citrat
- Sânge integral uman cu EDTA
- Sânge integral uman cu citrat

ATENȚIE

Acest test a fost validat exclusiv pentru utilizarea cu plasmă umană cu EDTA și citrat și cu sânge integral uman cu EDTA și citrat. Utilizarea altor tipuri de probe ar putea compromite performanța produsului.

5.4.2 Colectarea și manipularea probelor

Sângele trebuie recoltat cu sisteme standard de recoltare a sângelui disponibile în comerț (de exemplu, Sarstedt, Becton Dickinson, Greiner sau echivalente). Conținutul tubului trebuie amestecat imediat după recoltarea probei. Probele de sânge trebuie transportate la o temperatură cuprinsă între +2 °C și +8 °C. Transportul trebuie efectuat în conformitate cu instrucțiunile locale și naționale privind transportul materialului biologic. Înainte de utilizare, sângele integral cu EDTA sau citrat nu trebuie păstrat mai mult de 48 de ore la temperatura camerei (+20 °C până la +25 °C), 3 zile la temperaturi cuprinse între +2 °C și +8 °C sau 7 zile la temperaturi cuprinse între -25 °C și -15 °C.

Pentru generarea plasmei cu EDTA sau citrat, sângele integral trebuie centrifugat în conformitate cu instrucțiunile furnizate de producătorul sistemului de recoltare în termen de 24 de ore de la recoltare. Înainte de utilizare, plasma cu EDTA sau citrat nu trebuie păstrată mai mult de 48 de ore la temperatura camerei (+20 °C până la +25 °C), 5 zile la temperaturi cuprinse între +2 °C și +8 °C sau 2 luni la temperaturi cuprinse între -25 °C și -15 °C.

ATENȚIE

Tratați întotdeauna probele ca material infecțios și periculos (biologic), conform procedurilor de siguranță și de laborator. Pentru vărsările de material de probă, utilizați imediat un dezinfectant adecvat. Manevrați materialele contaminate ca fiind periculoase biologic.

ATENȚIE

Recoltarea, transportul, depozitarea sau pregătirea necorespunzătoare a probelor ar putea compromite performanța produsului.

NOTĂ

Depozitarea probelor în congelator nu afectează performanța setului. Când lucrați cu probe congelate, asigurați-vă că probele sunt complet dezghețate și amestecate corespunzător înainte de utilizare.

6. Avertismente, măsuri de precauție și limitări

- Înainte de prima utilizare, verificați integritatea produsului și a componentelor sale în ceea ce privește numărul, tipul și nivelul predefinit de umplere. Nu utilizați un produs defect sau incomplet; performanța produsului poate fi afectată.
- Condițiile de depozitare necorespunzătoare ar putea compromite performanța produsului.
- Nu utilizați produsele după data de expirare. Utilizarea produselor expirate ar putea compromite performanța produsului.
- Nu depășiți durata secvenței de decongelare-congelare și durata de manevrare specificate în aceste instrucțiuni de utilizare, deoarece acest lucru ar putea compromite performanța produsului.

- Manevrarea necorespunzătoare a componentelor produsului și a probelor poate cauza contaminarea și ar putea compromite performanța produsului:
  - Nu schimbați capacele fiolelor sau ale flacoanelor.
  - Depozitați materialele pozitive și/sau potențial pozitive separat de componentele setului.
  - Utilizați zone de lucru separate pentru pregătirea probelor/configurarea reacției și pentru activitățile de amplificare/detecție.
  - Aruncați întotdeauna mănușile după manevrarea materialelor pozitive și/sau potențial pozitive.
  - Nu deschideți plăcile PCR și/sau tuburile după amplificare.
- Nu amestecați componente din loturi diferite ale setului. Utilizarea de loturi diferite ale setului ar putea compromite performanța produsului.
- Acest test a fost validat exclusiv pentru utilizarea cu plasmă umană cu EDTA și citrat și cu sânge integral uman cu EDTA și citrat. Utilizarea altor tipuri de probe ar putea compromite performanța produsului.
- Tratați întotdeauna probele ca material infecțios și periculos (biologic), conform procedurilor de siguranță și de laborator. Pentru vărsările de material de probă, utilizați imediat un dezinfectant adecvat. Manevrați materialele contaminate ca fiind periculoase biologic.
- Recoltarea, transportul, depozitarea sau pregătirea necorespunzătoare a probelor ar putea compromite performanța produsului.
- Depozitarea eluaților în condiții necorespunzătoare poate duce la degradarea secvenței țintă de HAdV și poate compromite performanța produsului.
- Nu utilizați o versiune a protocolului de testare diferită de cea indicată pe codul de bare 2D din aceste instrucțiuni de utilizare. Utilizarea unei versiuni incorecte a protocolului de testare poate compromite performanța produsului.
- Lipsa centrifugării componentelor produsului după dezghețare poate cauza contaminarea cu reziduuri de reactivi din capace și poate compromite performanța produsului.
- Nu reutilizați capacele tuburilor pentru a evita contaminarea reactivilor, deoarece acest lucru ar putea compromite performanța produsului.
- Ca în cazul oricărui test de diagnosticare, rezultatele trebuie interpretate ținând cont de toate rezultatele clinice și de laborator.

- Prezența inhibitorilor PCR (de exemplu, heparina) ar putea determina rezultate fals negative sau invalide.
- Nu utilizați volume diferite de Master A și Master B pentru prepararea amestecului master mix față de cele specificate în aceste instrucțiuni de utilizare, deoarece acest lucru poate compromite performanța produsului.
- Nu depășiți durata de depozitare a amestecului PCR, deoarece acest lucru ar putea compromite performanța produsului.
- Nu încurcați probele sau codurile de identificare ale probelor în timpul pregătirii reacției PCR sau al transferului în instrumentul PCR. Acest lucru poate duce la rezultate fals pozitive sau fals negative, ca urmare a atribuirii incorecte a probelor.
- Nu utilizați alte succesiuni ale ciclurilor decât cele specificate în prezentele instrucțiuni de utilizare, deoarece acest lucru poate compromite performanța produsului.
- Nu utilizați alte setări de control pentru analiza datelor decât cele specificate în prezentele instrucțiuni de utilizare, deoarece acest lucru poate duce la rezultate incorecte ale examinării IVD.
- În cazul în care proba conține alți agenți patogeni în afară de HAdV, poate apărea o competiție cu amplificarea targetului sau reacții încrucișate, ceea ce poate duce la rezultate incorecte ale examinării IVD.
- Eliminarea deșeurilor periculoase și biologice trebuie să fie conformă cu reglementările locale și naționale, pentru a evita contaminarea mediului.
- Mutațiile potențiale din regiunile target ale genomului de HAdV acoperite de primerii și/sau sondele utilizate în set pot duce la subcuantificare și/sau la eșecul detectării prezenței agentului patogen.

7. Utilizarea setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 cu AltoStar® Workflow (flux de lucru)

Următoarea parte a acestor instrucțiuni de utilizare descrie utilizarea setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 împreună cu AltoStar® Workflow (flux de lucru). AltoStar® Workflow (flux de lucru) cuprinde diferite produse [sistemul de automatizare AltoStar® AM16, AltoStar® Connect software, setul AltoStar® Purification Kit 1.5, setul AltoStar® Internal Control 1.5, sistemul CFX96™ DW Dx, software-ul FastFinder Standalone și pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 pentru analiza datelor și interpretarea automată a

rezultatelor (opțional)]. Utilizarea acestor produse este descrisă în detaliu în instrucțiunile de utilizare respective.

- Manual de utilizare IVD al AltoStar® Automation System AM16 (Hamilton)
- Manual IVD al AltoStar® Connect Software (Hamilton)
- Instrucțiuni de utilizare pentru AltoStar® Purification Kit 1.5
- Instrucțiuni de utilizare pentru AltoStar® Internal Control 1.5
- Manual de utilizare pentru sistemele CFX96™ Dx și CFX96™ Deep Well Dx (Bio-Rad)
- Instrucțiuni de utilizare pentru software-ul FastFinder Standalone (UgenTec NV)

7.1 Volumul probei

Setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 este validat pentru purificarea acidului nucleic dintr-un volum de probă de 500 µl atunci când se utilizează sistemul de automatizare AltoStar® AM16. Trebuie furnizat un volum suplimentar de probă pentru a compensa volumul mort al tubului cu probă utilizat (consultați capitolul 7.2 Tuburi pentru probe).

7.2 Tuburi pentru probe

Tuburile cu probă adecvate pentru utilizarea cu sistemul de automatizare AltoStar® AM16 pot fi achiziționate de la altona Diagnostics (tub de 7 ml cu capac, 82 x 13 mm, VK000010). Alte tuburi cu probă pot fi testate de utilizator pentru a se verifica aplicabilitatea lor. Pentru detalii, consultați instrucțiunile de utilizare ale setului AltoStar® Purification Kit 1.5.

7.3 Codurile de bare ale probelor

Pentru identificarea automată a probelor de către sistemul de automatizare AltoStar® AM16, toate tuburile cu probă trebuie să fie etichetate cu un cod de bare adecvat. Pentru detalii, consultați instrucțiunile de utilizare ale setului AltoStar® Purification Kit 1.5.

7.4 Materiale și dispozitivele necesare, dar care nu sunt furnizate pentru fluxul de lucru AltoStar® Workflow

Materialele și dispozitivele prezentate în tabelul 3 trebuie comandate de la altona Diagnostics.

Tabelul 3: Materiale și dispozitive necesare

Material	Descriere	Nr. de comandă
AltoStar® Molecular Diagnostic Workflow	Pachet de produse care conține sistemul de automatizare AltoStar® Automation System AM16, software-ul AltoStar® Connect software (versiunea 1.7.4 sau superioară) și hardware IT	AM16
AltoStar® Detection	Pachet de produse care conține CFX96™ Deep Well Dx System cu software-ul CFX Manager™ Dx (versiunea 3.1), un scaner de coduri de bare și hardware IT	DT16
AltoStar® Purification Kit 1.5	Chimie de izolare și purificare a acidului nucleic pentru utilizare împreună cu sistemul de automatizare AltoStar® Automation System AM16	PK15-46
AltoStar® Internal Control 1.5	Extracția acidului nucleic și amplificarea și controlul detecției PCR	IC15-46
AltoStar® Automated Analysis Package	Computer personal cu software-ul FastFinder Standalone instalat (versiunea 1.0 sau ulterioară) și pachetul de pluginuri de testare pentru analiza datelor și interpretarea automată a rezultatelor	VK000045
PCR Plate	Placă cu 96 de godeuri, cu cod de bare și semi-manta, cu godeuri albe	VK000005
PCR Plate Sealing Foil	Folie de sigilare pentru placa PCR	VK000006
1,000 µl CO-RE Tips	Vârfuri de filtru de 1.000 µl pentru utilizare cu sistemul de automatizare AltoStar® Automation System AM16	VK000007

Material	Descriere	Nr. de comandă
300 µl CO-RE Tips	Vârfuri de filtru de 300 µl pentru utilizare cu sistemul de automatizare AltoStar® Automation System AM16	VK000008
Pooling Tube	Tub cu cod de bare pentru recoltarea reactivilor PCR	VK000002
Waste Bag	Pungă sterilă autoclavabilă pentru utilizare cu sistemul de automatizare AltoStar® Automation System AM16	VK000009
Screw Cap - red	Capac cu filet pentru tuburi QS1-QS4 (roșu)	VK000012
Screw Cap - blue	Capac cu filet pentru tuburi Master A (albastru)	VK000013
Screw Cap - purple	Capac cu filet pentru tuburi Master B (mov)	VK000015
Screw Cap - white	Capac cu filet pentru tuburi NTC (alb)	VK000016

Tabelul 4: Material și dispozitive suplimentare de laborator

Material	Descriere	Nr. de comandă
Material de etanșare a plăcilor	de ex., dispozitiv AltoStar® Plate Sealer	VK000023
	de ex., PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad)	VK000033

7.5 Materiale și dispozitive generale

- Agitator vortex
- Mănuși nepudrate (de unică folosință)
- Centrifugă pentru centrifugarea componentelor setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5
- Centrifugă pentru centrifugarea plăcilor PCR

Controale de proces

Controalele de proces pozitive și negative, care sunt tratate ca probe și supuse aceleiași proceduri de izolare a acizilor nucleici, trebuie testate în conformitate cu ghidurile sau cerințele reglementărilor locale, naționale și/sau federale ori ale organismelor de acreditare, pentru monitorizarea întregului proces.

Controalele de proces nu sunt furnizate de altona Diagnostics. În acest scop pot fi utilizate probe caracterizate anterior sau materiale de la ZeptoMetrix (NATtrol™ Adenovirus Type 1 Stock; nr. cat. NATADV1-STQ), conform instrucțiunilor de utilizare furnizate de producător.

7.6 Procedură

7.6.1 Prezentare generală pentru AltoStar® Workflow (flux de lucru)

Etapele fluxului de lucru AltoStar® Workflow complet sunt rezumate în tabelul 5. Informații privind setările specifice pentru utilizarea cu setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 sunt furnizate în capitolul 7.6.2 Programarea unui ciclu AltoStar®. Pentru instrucțiuni detaliate privind etapele 1-5, consultați instrucțiunile de utilizare ale setului AltoStar® Purification Kit 1.5, ale AltoStar® Connect software și ale sistemului de automatizare AltoStar® AM16.

Etapele 6-9 sunt descrise mai detaliat în capitolele 7.6.3 Pornirea unui ciclu de configurare PCR până la 7.6.6 Pornirea unui ciclu PCR.

Etapele 10 și 11 diferă în funcție de interpretarea manuală sau automată a rezultatelor. Mai multe detalii privind interpretarea manuală a rezultatelor pot fi găsite în capitolele 7.6.7 Analiza datelor PCR utilizând software-ul CFX Manager™ Dx până la 7.6.10 Exportul rezultatelor PCR pentru interpretarea manuală a rezultatelor. Etapele pentru analiza opțională a datelor și interpretarea automată a rezultatelor utilizând software-ul FastFinder sunt descrise mai detaliat în capitolul 7.6.11 Analiza datelor PCR și interpretarea automată a rezultatelor utilizând software-ul FastFinder Standalone.

Tabelul 5: Prezentare generală pentru AltoStar® Workflow (flux de lucru)

Etapă	Acțiune
1. Pornirea sistemului de automatizare AltoStar® AM16	• Porniți sistemul de automatizare AltoStar® AM16. • Porniți computerul și monitorul. • Porniți AltoStar® Connect software.
2. Efectuarea întreținerii	• În bara de meniu, faceți clic pe **Application** → **Instrument Maintenance** (Aplicație → Întreținerea instrumentului). ◦ Dacă este necesară efectuarea întreținerii săptămânale, faceți clic pe **Start Weekly Maintenance** (Pornire întreținere săptămânală). ◦ Dacă este necesară efectuarea întreținerii zilnice, faceți clic pe **Start Daily Maintenance** (Pornire întreținere zilnică). • Urmați instrucțiunile de pe ecran pentru procesul de întreținere.
3. Programarea unui ciclu AltoStar®	• În bara de meniu, faceți clic pe **Program Run** (Executare program) → **Program Run** (Executare program) (**AltoStar® Purification**). Sau reveniți la ecranul Start (Pornire) și faceți clic pe butonul **Program Run** (Executare program). • Introduceți probe sau importați-le din LIMS. • Selectați următorul test pentru probe, cu excepția cazului în care acesta a fost deja importat din LIMS: ◦ AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 • Faceți clic pe butonul **Create Run** (Creare ciclu) din bară de instrumente pentru a crea ciclul AltoStar®.

Etapă	Acțiune
4. Începerea unui ciclu de purificare	• În bara de meniu, faceți clic pe **Purification** → **Start Purification** (Purificare → Pornire purificare). Sau reveniți la ecranul Start (Pornire) și faceți clic pe butonul **Start Purification** (Pornire purificare). • Selectați ciclul de purificare care urmează să fie pornit pentru a afișa probele incluse în ciclul de purificare selectat. • Pregătiți reactivii de purificare: ◦ Asigurați-vă că reactivii de purificare care urmează să fie utilizați au același număr de încărcare (cu excepția AltoStar® Internal Control 1.5) și nu sunt expirați. ◦ Dacă precipitatele sunt vizibile în Lysis Buffer (Soluție-tampon de liză), încălziți-l (≤ +50 °C) până la dizolvarea completă. ◦ Dezghețați IC (AltoStar® Internal Control 1.5) și omogenizați prin agitare timp de 5 secunde. ◦ Omogenizați prin agitare Magnetic Beads (Granulele magnetice) timp de 5 secunde fără a uda capacul. • Pregătiți probele pentru procesul de purificare care urmează să fie pornit, conform instrucțiunilor de utilizare a setului AltoStar® Purification Kit 1.5. • Faceți clic pe butonul **Start Run** (Pornire ciclu) din bară de instrumente. • Urmați dialogurile de încărcare și încărcați instrumentul în consecință. • Confirmați mesajul Loading complete (Încărcare finalizată) făcând clic pe **OK** sau așteptați 10 secunde. Sistemul va efectua acum automat ciclul de purificare.

Etapă	Acțiune
5. Finalizarea ciclului de purificare	• Asigurați-vă că tava de încărcare este goală și confirmați dialogul Run finished (Ciclu finalizat) cu **OK**. • Urmați instrucțiunile din dialogul Maintenance (Întreținere) și confirmați cu **OK**. • Sigilați și depozitați componentele setului AltoStar® Purification Kit 1.5 care pot fi reutilizate. Eluatele din placa pentru eluat desigilată sunt stabile la temperatura camerei (max. +30 °C) timp de 4 ore în total. • Dacă ciclul de configurare PCR aferent nu este pornit imediat, sigilați placa de eluat cu o folie de sigilare a plăcii pentru eluat și păstrați-o la o temperatură cuprinsă între +2 °C și +8 °C timp de maximum 24 de ore. • Vizualizați rezultatele ciclului de purificare pentru a confirma procesarea cu succes a fiecărei probe.
6. Pornirea unui ciclu de configurare PCR	• În bara de meniu, faceți clic pe **PCR Setup** (Configurare PCR) → **Start PCR Setup** (Pornire configurare PCR). Sau reveniți la ecranul Start (Pornire) și faceți clic pe butonul **Start PCR Setup** (Pornire configurare PCR). • Selectați ciclul de configurare PCR care urmează să fie pornit pentru a afișa placă pentru eluat și reactivii incluși în ciclul de configurare PCR selectat. • Pregătiți reactivii PCR: ◦ Asigurați-vă că probele principale și de control care urmează să fie utilizate provin din același lot de seturi și nu sunt expirate. ◦ Dezghețați cantitatea necesară de tuburi master și de control, omogenizați-le scurt prin agitare și centrifugați-le într-o centrifugă. • Dacă placa pentru eluat este sigilată, centrifugați-o scurt și desigilați-o cu atenție. • Faceți clic pe butonul **Start Run** (Pornire ciclu) din bară de instrumente. • Urmați dialogul Loading (Se încarcă) și încărcați instrumentul în consecință. • Confirmați mesajul Loading complete (Încărcare finalizată) făcând clic pe **OK** sau așteptați 10 secunde. Sistemul va efectua acum automat ciclul de configurare PCR.

Etapă	Acțiune
7. Finalizarea unui ciclu de configurare PCR	• Asigurați-vă că tava de încărcare este goală și confirmați dialogul Run finished (Ciclu finalizat) cu **OK**. • Urmați instrucțiunile din dialogul Maintenance (Întreținere) și confirmați cu **OK**. • Închideți și depozitați componentele setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 care pot fi reutilizate. • Vizualizați rezultatele ciclului de configurare PCR pentru a confirma procesarea cu succes a fiecărei probe.
8. Sigilarea plăcii PCR	• Sigilați placa PCR cu o folie de sigilare a plăcii PCR.
9. Pornirea ciclului PCR	• Porniți CFX96™ DW Dx, computerul conectat și monitorul. • Porniți software-ul CFX Manager™ Dx. • Deschideți CFX96™ DW Dx. • Centrifugați placa PCR și introduceți-o în CFX96™ DW Dx. • Selectați **File** → **Open** → **LIMS File…** (Fișier → Deschidere → Fișier LIMS…) din bara de meniu. • Scanați codul de bare al plăcii PCR cu scanerul de coduri de bare portabil. • Închideți CFX96™ DW Dx. • Faceți clic pe butonul **Start Run** (Pornire ciclu) pentru a porni ciclul PCR. Denumiți și salvați fișierul ciclului PCR. CFX96™ DW Dx va efectua acum automat ciclul PCR.

Etapă	Acțiune	
Etapă	Acțiuni pentru analiza datelor și generarea raportului cu software-ul CFX Manager™ Dx în vederea interpretării manuale ulterioare a rezultatelor sau a interpretării rezultatelor prin LIMS	Acțiuni pentru analiza opțională a datelor și interpretarea automată a rezultatelor utilizând software-ul FastFinder Standalone
10. Separarea testelor pentru analiza individuală	• Separați toate testele din ciclul PCR în grupuri de godeuri distincte.	Nu este necesar.
11. Analizarea datelor și interpretarea rezultatelor ciclului PCR	Pentru fiecare grup de godeuri în parte: • Efectuați corecția de referință în toate godeurile pentru toate canalele de detecție utilizate. • Excludeți godeurile cu semnale PCR neregulate. • Setați limitele tuturor canalelor de detecție în conformitate cu controalele. • Excludeți godeurile care conțin date invalide. • Generați fișierul cu rezultate LIMS pentru exportul rezultatelor către LIMS. • Generați raportul cu rezultate pentru interpretarea manuală a rezultatelor.	• Utilizați software-ul FastFinder Standalone și pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 pentru analiza datelor și interpretarea automată a rezultatelor.

ATENȚIE

Depozitarea eluatelor în condiții necorespunzătoare poate duce la degradarea secvenței target HAdV și poate compromite performanța produsului.

7.6.2 Programarea unui ciclu AltoStar®

Pentru informații detaliate privind pornirea unui ciclu AltoStar®, consultați instrucțiunile de utilizare a setului AltoStar® Purification Kit 1.5, a software-ului AltoStar® Connect software și a sistemului de automatizare AltoStar® AM16. Setările specifice pentru utilizarea cu setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 sunt prezentate mai jos:

- Pentru aplicații de testare cantitativă sunt selectate QS1-4 și NTC, iar pentru aplicația de testare calitativă sunt selectate QS4 și NTC.
- Volumul necesar de probă este 500 µl plus volumul mort pentru tubul de probă respectivă (consultați capitolele 7.1 Volumul probei și 7.2 Tuburi pentru probe).
- Volumul necesar de eluat pentru setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 este de 10 µl.
- Asigurați-vă că se utilizează versiunea corectă a protocolului de testare pentru ciclu. Pentru informații despre versiunea actuală a protocolului, consultați capitolul 17. Protocol de testare pentru AltoStar® Connect software și informații pentru integrarea în LIMS. Protocolul de testare respectiv este codificat în codul de bare 2D afișat acolo. Pentru informații privind purificarea și importarea protocolului de testare în software-ul AltoStar® Connect software, consultați instrucțiunile de utilizare respective.

ATENȚIE

Nu utilizați o versiune a protocolului de testare diferită de cea indicată pe codul de bare 2D din aceste instrucțiuni de utilizare. Utilizarea unei versiuni incorecte a protocolului de testare poate compromite performanța produsului.

7.6.3 Pornirea unui ciclu de configurare PCR

1. Selectați **PCR Setup** → **Start PCR Setup** (Configurare PCR → Pornire configurare PCR) din bara de meniu. Alternativ, reveniți la ecranul Start al AltoStar® Connect software și selectați butonul **Start PCR Setup** (Pornire configurare PCR). Ecranul Start PCR Setup Run (Pornire ciclu de configurare PCR) este afișat.

Ciclurile de configurare PCR în așteptare sunt afișate în tabelul Programmed PCR Setup Runs (Cicluri de configurare PCR programare) din partea stângă a ecranului.

2. Selectați configurarea PCR care urmează să fie pornită din tabelul Programmed PCR Setup Runs (Cicluri de configurare PCR programare).

   - Probele incluse în ciclul de configurare PCR selectat sunt afișate în tabelul din partea dreaptă sus a ecranului [Samples in selected PCR Setup Run (Probe din ciclul de configurare PCR selectat)].
   - QS și controalele necesare pentru configurarea PCR selectată sunt afișate în tabelul din partea dreaptă, la mijlocul ecranului [Controls in selected PCR Setup Run (Controale din ciclul de configurare PCR selectat)].
   - Numărul de tuburi master necesare pentru configurarea PCR selectată este afișat în tabelul din partea dreaptă jos a ecranului [Required master tubes for the selected PCR Setup Run (Tuburi master necesare pentru ciclul de configurare PCR selectat)].

NOTĂ

Numărul de probe prioritizate dintr-un ciclu de configurare PCR este afișat în coloana **No. of prioritized Samples** (Nr. de probe prioritizate). Efectuați mai întâi configurările PCR care includ probe prioritare pentru a facilita procesarea cât mai rapidă a acestora.

Înainte de a face clic pe butonul **Start Run** (Pornire ciclu) din bara de instrumente, pregătiți reactivii necesari conform descrierii din capitolul 7.6.3.1 Pregătirea reactivilor pentru un ciclu de configurare PCR. Dacă placa pentru eluat necesară pentru ciclul de configurare PCR selectat a fost sigilată pentru stocare, pregătiți-o conform instrucțiunilor de utilizare din AltoStar® Purification Kit 1.5.

7.6.3.1 Pregătirea reactivilor pentru un ciclu de configurare PCR

1. Dezghețați complet la temperatura camerei (max. +30 °C) CI necesară, controalele și numărul necesar de tuburi master.
2. Amestecați reactivii prin agitare ușoară cu vortexul.

3. Centrifugați tuburile pentru scurt timp pentru a îndepărta picăturile de pe capac.

ATENȚIE

Lipsa centrifugării componentelor produsului după dezghețare poate cauza contaminarea cu reziduuri de reactivi din capace și poate compromite performanța produsului.

7.6.3.2 Încărcarea sistemului de automatizare AltoStar® AM16 pentru un ciclu de configurare PCR

Pentru informații detaliate privind procesul de încărcare, consultați instrucțiunile de utilizare ale sistemului de automatizare AltoStar® AM16 și ale AltoStar® Connect software.

1. Faceți clic pe butonul **Start Run** (Pornire ciclu) din bara de instrumente a ecranului Start PCR Setup Run (Pornire ciclu de configurare PCR) pentru a afișa caseta de dialog Loading (Se încarcă).

Caseta de dialog Loading (Se încarcă) conține o reprezentare vizuală a platformei sistemului de automatizare AltoStar® AM16 în partea de sus și un tabel care specifică transportoarele, traseele respective de pe platforma sistemului de automatizare AltoStar® AM16 pentru fiecare transportor, materialul care trebuie încărcat pe fiecare transportor și comentarii referitoare la încărcarea transportorului.

NOTĂ

Pentru a vizualiza poziția unui element pe un transportor și poziția transportorului pe platforma sistemului de automatizare AltoStar® AM16, selectați rândul corespunzător din tabelul din caseta de dialog Loading (Se încarcă).

Poziția elementului și a transportorului său este vizualizată:

- Evidențiată cu roșu în reprezentarea vizuală a platformei instrumentului
- Pe sistemul de automatizare AltoStar® AM16 prin aprinderea intermitentă a luminițelor de încărcare deasupra traseelor unde trebuie amplasat transportorul selectat

2. Încărcați materialul necesar, placa pentru eluat pregătită și reactivii pregătiți pe transportoarele adecvate.

- Înlocuiți numai stativele pentru vârfuri de 1.000 µl **complet goale** cu stativele pentru vârfuri de 1.000 µl **complet pline** de pe transportorul pentru vârfuri.
- Înlocuiți numai stativele pentru vârfuri de 300 µl **complet goale** cu stativele pentru vârfuri de 300 µl **complet pline** de pe transportorul pentru vârfuri și plăci.

NOTĂ

Schimbarea stativelor pentru vârfuri care nu sunt complet goale, precum și manipularea vârfurilor individuale pot interfera cu gestionarea automată a vârfurilor și pot provoca întreruperea ciclului.

- Așezați placa pentru eluat necesară cu godeul A1 în stânga poziției plăcii negre.
- Așezați o placă PCR cu godeul A1 în stânga plăcii frontale argintii.
- Încărcați un transportor de tuburi 24 cu un tub de colectare neutilizat pentru fiecare test din ciclul de configurare PCR.
- Împingeți ușor tuburile până la fundul transportorului și rotiți tuburile până când codurile de bare ale tuburilor sunt vizibile prin fereastra transportorului.
- Încărcați transportorul de tuburi pentru reactivi 32 cu componentele de testare necesare pentru ciclul de configurare PCR.

- Împingeți ușor tuburile până la fundul transportorului și rotiți tuburile până când codurile de bare ale tuburilor sunt vizibile prin fereastra transportorului.

NOTĂ

Poziția tuburilor individuale pe transportoare este arbitrară.

NOTĂ

Volumul componentelor încărcate nu este verificat de sistem înainte de procesare. Volumul insuficient al componentelor va împiedica finalizarea configurării PCR pentru testul afectat.

NOTĂ

Pornirea unui ciclu de configurare PCR cu capacele încă pe tuburi poate provoca întreruperea procesului în timpul procesării.

3. Încărcați transportoarele cu codul de bare al transportatorului spre partea din spate, orientat spre dreapta.
4. Introduceți transportoarele umplute pe traseele corespunzătoare dintre glisoarele din față și din spate ale tăvii de încărcare, până când acestea ating cârligele de oprire de pe partea opusă a tăvii de încărcare.

NOTĂ

Împingerea transportoarelor dincolo de cârligele de oprire poate deteriora instrumentul și poate interfera cu procesul de încărcare.

5. Verificați dacă fișa de ejectare a vârfurilor și recipientul pentru deșeuri de vârfuri sunt în poziția corectă și dacă în recipient este introdusă o pungă nouă pentru deșeuri.
6. Faceți clic pe **OK** în caseta de dialog Loading (Se încarcă) pentru a continua procesul de încărcare.

NOTĂ

Dacă faceți clic pe **Cancel** (Anulare), ciclul de configurare PCR va fi anulat, dar poate fi repornit (consultați capitolul 7.6.3 Pornirea unui ciclu de configurare PCR).

Sistemul de automatizare AltoStar® AM16 atrage transportoarele în interiorul instrumentului și efectuează verificarea codurilor de bare.

NOTĂ

Sistemul de automatizare AltoStar® AM16 verifică automat:

- Tipul și localizarea corectă a transportoarelor încărcate
- Identitatea și poziția corectă a articolelor încărcate pe transportoare
- Sincronizarea loturilor componentelor seturilor individuale de teste AltoStar®
- Valabilitatea tuturor componentelor testului AltoStar® încărcate
- Poziționarea corectă a fișei de ejectare a vârfurilor

Dacă vreuna dintre aceste verificări nu are un rezultat pozitiv, utilizatorul primește un mesaj care specifică problema și instrucțiuni pentru remedierea acesteia. Pentru mai multe informații privind gestionarea erorilor, consultați instrucțiunile de utilizare ale AltoStar® Connect software.

NOTĂ

Modificarea poziției oricărui element încărcat după ce transportatorul a fost introdus în instrument poate duce la întreruperea ciclului de configurare PCR și/sau la deteriorarea instrumentului.

După ce toate verificările au fost efectuate cu succes, se afișează caseta de dialog Loading complete (Încărcare finalizată).

7. Confirmați caseta de dialog Loading complete (Încărcare finalizată) făcând clic pe **OK** sau așteptați 10 secunde pentru pornirea automată a procesului.

NOTĂ

Dacă faceți clic pe **Cancel** (Anulare), ciclul de configurare PCR va fi anulat, dar poate fi repornit (consultați capitolul 7.6.3 Pornirea unui ciclu de configurare PCR).

Ciclul de configurare PCR este inițiat și va fi efectuat fără intervenția utilizatorului.

7.6.3.3 În timpul ciclului de configurare PCR

Nu este necesară nicio altă interacțiune din partea utilizatorului până la finalizarea ciclului de configurare PCR. Se afișează ecranul Processing Status (Starea de prelucrare), care arată starea ciclului de configurare PCR și timpul estimat rămas.

NOTĂ

Împingerea sau tragerea transportoarelor sau a ușii sistemului de automatizare AltoStar® AM16 în timpul unui ciclu de configurare PCR poate întrerupe ciclul.

7.6.4 Sfârșitul ciclului de configurare PCR

La finalul ciclului de configurare PCR, se afișează dialogul Run finished (Ciclu finalizat).

1. Asigurați-vă că tava de încărcare este goală.
2. Confirmați caseta de dialog Run finished (Ciclu finalizat) făcând clic pe **OK**.

Sistemul de automatizare AltoStar® AM16 va descărca transportoarele. Asigurați-vă că nu stați în calea transportoarelor care se descarcă.

După descărcare, se afișează dialogul Maintenance (Întreținere).

3. Urmați instrucțiunile din dialogul Maintenance (Întreținere).

Tabelul din dialog afișează numărul de reacții din tuburile master care nu au fost utilizate în ciclul de configurare PCR.

4. Dacă urmează să se înceapă imediat un alt ciclu de configurare PCR folosind placa pentru eluat deja încărcată, placa pentru eluat poate rămâne nesigilată pe poziția transportorului. Dacă acest lucru **nu** este cazul, sigilați și depozitați placa pentru eluat. Pentru mai multe detalii, consultați instrucțiunile de utilizare ale setului AltoStar® Purification Kit 1.5.

NOTĂ

Eluatele din placa pentru eluat sunt stabile la temperatura camerei (max. +30 °C) pentru un total de 4 ore după finalizarea ciclului de purificare.

5. Închideți tuburile cu reactivi folosind capace de tuburi neutilizate și potrivite.

ATENȚIE

Nu reutilizați capacele tuburilor pentru a evita contaminarea reactivilor, deoarece acest lucru ar putea compromite performanța produsului.

6. Depozitați reactivii pentru reutilizare conform descrierii din capitolul 4.2 Manevrare.
7. Eliminați materialele utilizate (consultați capitolul 10. Depozitare).
8. Confirmați dialogul Maintenance (Întreținere) făcând clic pe **OK**.

7.6.4.1 Rezultatele ciclului de configurare PCR

Rezultatele ciclului de configurare PCR sunt salvate în AltoStar® Connect software.

1. Faceți clic pe **PCR Setup** → **PCR Setup Results** (Configurare PCR → Rezultate configurare PCR) din bara de meniu pentru a accesa ecranul Results (Rezultate).

Ecranul Results (Rezultate) afișează un tabel cu toate probele utilizate în ultimul ciclu de configurare PCR și o coloană **Status** (Stare) în partea dreaptă, care indică dacă procesul de configurare PCR pentru o anumită probă a fost finalizat (consultați tabelul 6).

Tabelul 6: Rezultatele ciclului de configurare PCR

Stare	Rezultatul ciclului de configurare PCR
Processed (Prelucrat)	• Eluatul a fost prelucrat cu succes în ciclul de configurare PCR. • Amestecul PCR rezultat este gata pentru utilizare într-un ciclu PCR.
Error (Eroare)	• Eluatul nu a fost prelucrat cu succes. • Amestecul PCR respectiv va fi omis automat în următoarea analiză PCR.

2. Pentru a vizualiza rezultatele ciclurilor de configurare PCR anterioare, faceți clic pe butonul **Load** (Încărcare) din bara de meniu, selectați ciclul de configurare PCR dorit din lista din caseta de dialog Load Results (Încărcare rezultate) care se deschide și faceți clic pe **OK**.

3 fișiere cu rezultatele ciclului de configurare PCR sunt generate automat de AltoStar® Connect software:

- Un fișier LIMS (.XML) pentru a transmite informații detaliate despre ciclul de configurare PCR, inclusiv rezultatele, înapoi la LIMS
- Un raport (.PDF) care conține informații detaliate despre ciclul de configurare PCR, inclusiv rezultatele, în scopuri de documentare
- Un fișier pentru ciclator (.PLRN) pentru programarea automată a CFX96™ DW Dx

Aceste fișiere sunt salvate în locația specificată în setările de sistem ale AltoStar® Connect software.

NOTĂ

Fișierele cu rezultatele ciclului de configurare PCR pot fi generate din nou încărcând ciclul de configurare PCR respectiv și făcând clic pe butonul **Create LIMS File** (Creare fișier LIMS) pentru a genera fișierul LIMS, pe butonul **Create Report** (Creare raport) pentru a genera raportul sau pe butonul **Create Bio-Rad Cycler File** (Creare fișier pentru ciclatorul Bio-Rad) pentru a genera fișierul pentru ciclator.

7.6.5 Sigilarea plăcii PCR

După finalizarea ciclului de configurare PCR, placa PCR trebuie sigilată cu folie de sigilare a plăcii PCR. Se recomandă utilizarea dispozitivului AltoStar® Plate Sealer [4s3™ Semi-Automatic Sheet Heat Sealer (4titude)] sau PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad). Compatibilitatea altor materiale de etanșare a plăcilor decât cele recomandate trebuie evaluată de utilizator.

Dacă se folosește unul dintre materialele de etanșare a plăcilor recomandate pentru sigilare, procedați astfel:

1. Porniți materialul de etanșare a plăcilor și asigurați-vă că adaptorul pentru plăci nu se află în tava de încărcare.
2. Asigurați-vă că setările materialului de etanșare a plăcilor sunt următoarele:

Tabelul 7: Setările materialului de etanșare a plăcilor

Material de etanșare a plăcilor	Setări	
	Temperatură [°C]	Timp [s]
Dispozitivul AltoStar® Plate Sealer [4s3™ Semi-Automatic Sheet Heat Sealer (4titude)]	170	2
PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad)	175	3

3. Așteptați până când se atinge temperatura setată. Acest lucru poate dura câteva minute.
4. Așezați placa PCR pe adaptorul de plăci al materialului de etanșare a plăcilor.
5. Plasați o folie de sigilare a plăcii PCR pe placa PCR astfel încât inscripția „THIS SIDE UP” (această parte în sus) să fie lizibilă. Asigurați-vă că toate godeurile plăcii PCR sunt acoperite de folie și că niciun godeu nu este acoperit de scris.

NOTĂ

Folosirea materialului de etanșare a plăcilor fără adaptorul de plăci plasat în tava de încărcare poate face ca echipamentul să nu funcționeze. În acest caz, contactați suportul tehnic altona Diagnostics pentru asistență tehnică (consultați capitolul 12. Asistență tehnică).

NOTĂ

Dacă folia de sigilare a plăcii PCR sau cadrul acesteia este plasată incorect, folia se poate lipi de placa de încălzire din materialul de etanșare a plăcilor în timpul sigilării. Acest lucru va face ca echipamentul să nu funcționeze. În acest caz, sau dacă pasul de sigilare a fost inițiat fără o folie de sigilare pentru placa PCR, lăsați materialul de etanșare a plăcilor să se răcească la temperatura camerei și contactați suportul tehnic altona Diagnostics pentru asistență tehnică (consultați capitolul 12. Asistență tehnică).

6. Asamblați cadrul de sigilare deasupra pentru a fixa folia de sigilare în poziție.
7. Deschideți tava de încărcare apăsând butonul **Operate** (Operare)*/ ⏏**.
8. Plasați ansamblul format din adaptorul de plăci, placa PCR, folia de sigilare a plăcii PCR și cadrul de sigilare în materialul de etanșare a plăcilor și apăsați butonul **Operate** (Operare)*/ ⏏**.
9. Tava de încărcare se închide automat, sigilează pentru timpul setat și se redeschide automat.
10. Scoateți placa PCR sigilată și adaptorul de plăci din materialul de etanșare a plăcilor și închideți materialul de etanșare a plăcilor apăsând butonul **Close** (Închidere)*/ ⏏**.

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

** PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad)

7.6.5.1 Stabilitatea amestecului PCR

După finalizarea configurării PCR, amestecul PCR din placa PCR sigilată este stabil la temperatura camerei (max. +30 °C) timp de 30 de minute.

ATENȚIE

Nu depășiți timpul de păstrare al amestecului PCR, deoarece acest lucru ar putea compromite performanța produsului.

7.6.6 Pornirea unui ciclu PCR

Ciclul PCR se efectuează pe un CFX96™ DW Dx sub controlul CFX Manager™ Dx software.

1. Porniți CFX96™ DW Dx, computerul atașat și monitorul.
2. Porniți CFX Manager™ Dx software.
3. În bara de meniu a CFX Manager™ Dx software selectați **File** → **Open** → **LIMS File…** (Fișier → Deschidere → Fișier LIMS) pentru a deschide dialogul Open LIMS File (Deschidere fișier LIMS).
4. În dialogul Open LIMS File (Deschidere fișier LIMS) care se deschide, asigurați-vă că cursorul clipește în câmpul **File name** (Denumire fișier) din partea de jos. Dacă nu clipește, faceți clic în câmpul **File name** (Denumire fișier).
5. Scanați codul de bare al plăcii PCR cu scannerul de coduri de bare portabil pentru a selecta și deschide automat fișierul LIMS corect. Dialogul Run Setup (Configurare ciclu) este afișat.

NOTĂ

Toți parametrii necesari pentru pornirea ciclului PCR sunt transferați automat din AltoStar® Connect software către CFX96™ DW Dx prin intermediul fișierului ciclator.

6. Faceți clic pe butonul **Open Lid** (Deschidere capac) în dialogul Run Setup (Configurare ciclu) pentru a deschide capacul CFX96™ DW Dx.
7. Centrifugați scurt placa PCR sigilată pentru a asigura că tot lichidul se află la fundul godeurilor.
8. Introduceți placa PCR sigilată în blocul de încălzire al CFX96™ DW Dx cu godeul A1 în partea stângă.

9. Închideți CFX96™ DW Dx făcând clic pe butonul **Close Lid** (Închidere capac) din dialogul Run Setup (Configurare ciclu).
10. Porniți ciclul PCR făcând clic pe butonul **Start Run** (Pornire ciclu) din dialogul Run Setup (Configurare ciclu).

7.6.6.1 În timpul ciclului PCR

Nu este necesară nicio interacțiune din partea utilizatorului până la finalizarea ciclului PCR. Se afișează dialogul Run Details (Detalii ciclu), care indică starea ciclului PCR și timpul estimat rămas.

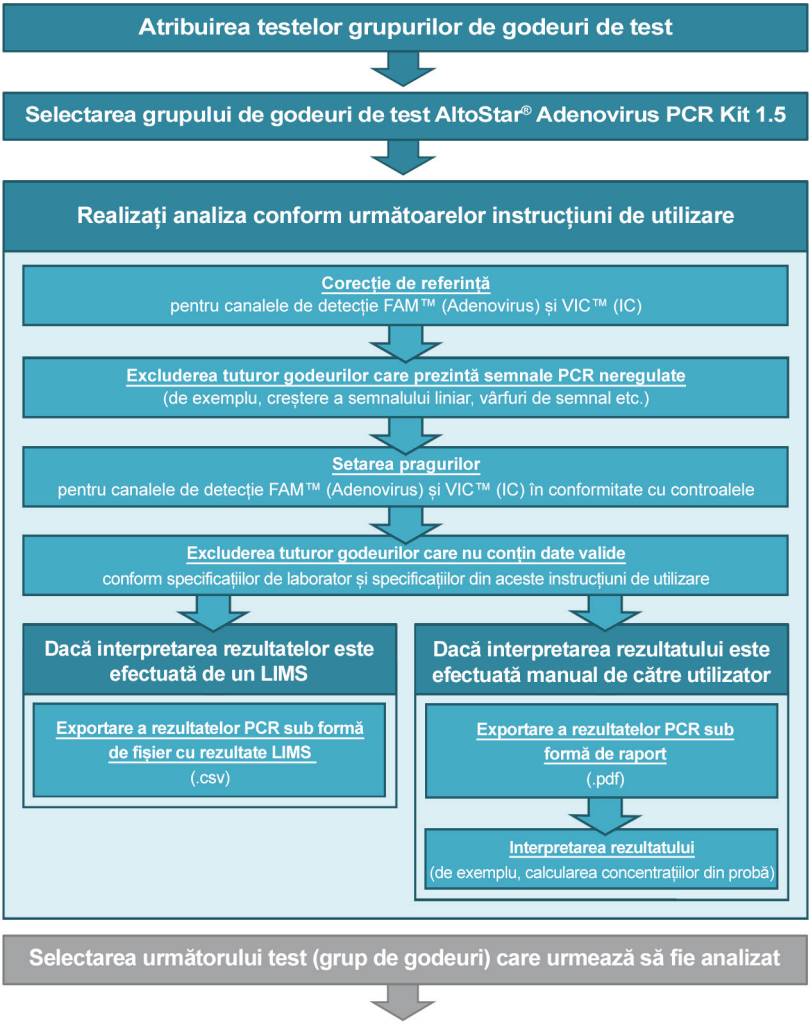
NOTĂ

Deschiderea capacului CFX96™ DW Dx în timpul unui ciclu PCR, fie prin apăsarea butonului frontal de pe capac, fie făcând clic pe **Open Lid** (Deschidere capac) în dialogul Run Details (Detalii ciclu) va anula rularea și va invalida toate rezultatele.

La finalul rulării PCR, se afișează fereastra Data Analysis (Analiza datelor), care arată curbele de amplificare, dispunerea plăcii și rezultatele.

7.6.7 Analiza datelor PCR utilizând software-ul CFX Manager™ Dx

Rezultatele tuturor testelor (grupurilor de godeuri) de pe placa PCR trebuie analizate în ordinea prezentată în ilustrația 1.



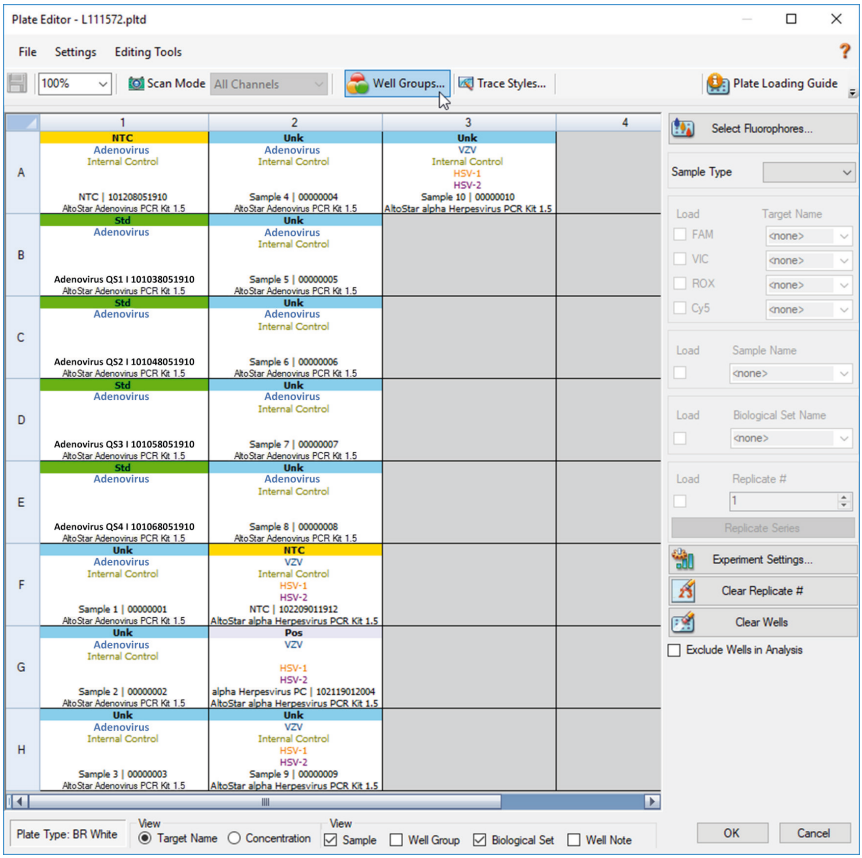
Ilustr. 1: Procesul de analiză a datelor PCR utilizând software-ul CFX Manager™ Dx

7.6.7.1 Atribuirea testelor la grupuri de godeuri

AltoStar® Workflow (flux de lucru) procesează unul sau mai multe teste PCR simultan pe o singură placă PCR. Totuși, fiecare test trebuie analizat separat de utilizator conform instrucțiunilor de utilizare ale testului respectiv.

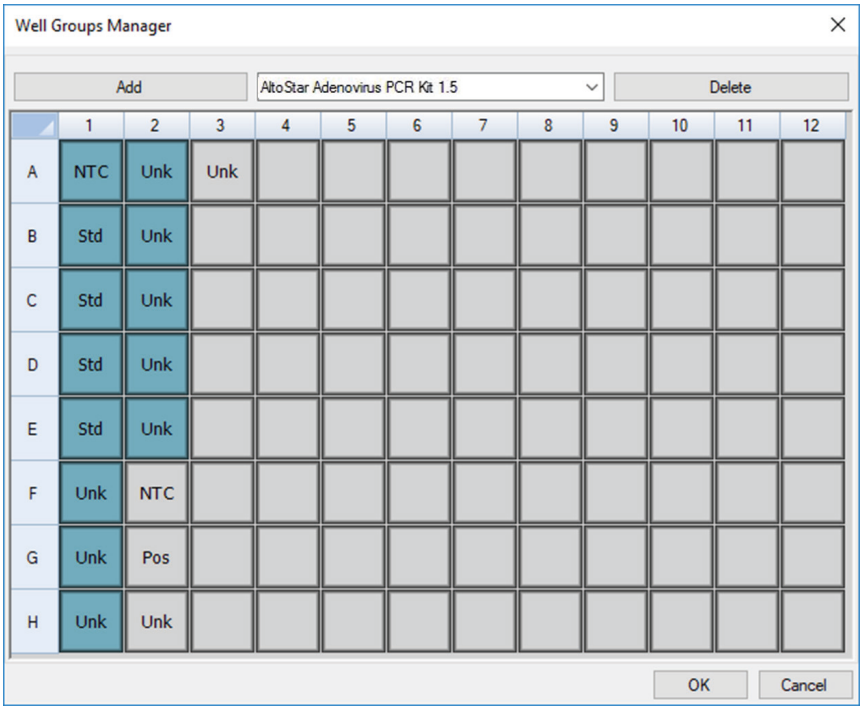
În acest scop, toate testele de pe o placă PCR trebuie atribuite grupurilor individuale de godeuri în CFX Manager™ Dx software de către utilizator.

1. În fereastra Data Analysis (Analiza datelor), faceți clic pe butonul **Plate Setup** (Configurare placă) din bara de instrumente și selectați **View/Edit Plate** (Vizualizare/editare placă). Se afișează caseta de dialog Plate Editor (Editor placă) (consultați ilustrația 2).



Ilustr. 2: Caseta de dialog Plate Editor (Editor placă)

2. În caseta de dialog Plate Editor (Editor placă), faceți clic pe **Well Groups...** (Grupuri de godeuri...) din bara de instrumente. Se afișează caseta de dialog Well Groups Manager (Manager grupuri de godeuri) (consultați ilustrația 3).
3. Faceți clic pe butonul **Add** (Adăugare).
4. Introduceți numele primului test în caseta de text.
5. Selectați toate godeurile din zona plăcii PCR care aparțin primului test (consultați ilustrația 3). Godeurile care aparțin unui test individual pot fi identificate în dialogul Plate Editor (Editor placă) prin intrarea din câmpul **Biological Set** (Set biologic).

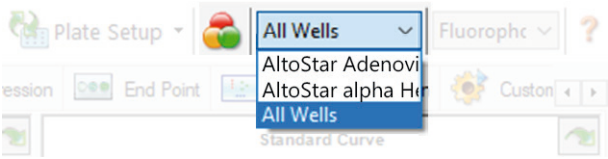


Ilustr. 3: Caseta de dialog Well Groups Manager (Manager grupuri de godeuri)

6. Repetați pașii 3-5 pentru toate testele de pe placa PCR.
7. Confirmați atribuirea grupurilor de godeuri făcând clic pe **OK**. Dialogul Well Groups Manager (Manager grupuri de godeuri) se închide.
8. Închideți caseta de dialog Plate Editor (Editor placă) făcând clic pe **OK**.
9. Confirmați aplicarea modificărilor făcând clic pe **Yes** (Da).

În fereastra Data Analysis (Analiza datelor), asigurați-vă că selectați **Well Group** (Grup de godeuri) al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5. Așadar, faceți clic pe meniul vertical **Well Group** (Grup de godeuri) de lângă butonul **Well Group** (Grup de godeuri) (consultați ilustrația 4) din bara de instrumente. Nu utilizați *„All Wells”* (Toate godeurile) **Well Group** (Grup de godeuri). Selectarea din ilustrația 4 este utilizată doar ca exemplu general.

Înainte de a analiza rezultatele, asigurați-vă că grupul de godeuri al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 conține toate godeurile setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 și niciun godeu din alte teste.



Ilustr. 4: Butonul Well Group (Grup de godeuri) și meniul vertical Well Group (Grup de godeuri)

NOTĂ

Analiza combinată a mai multor teste poate conduce la rezultate incorecte.

ATENȚIE

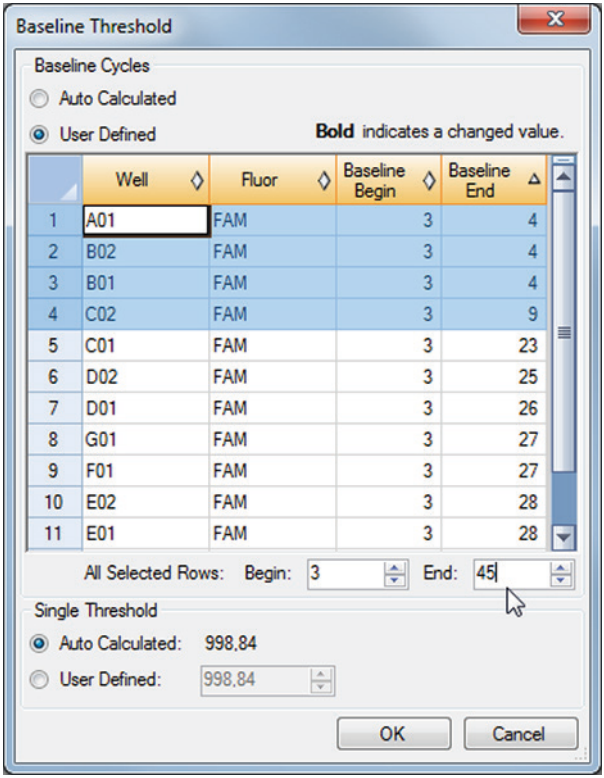
Ca în cazul oricărui test de diagnosticare, rezultatele trebuie interpretate ținând cont de toate rezultatele clinice și de laborator.

7.6.7.2 Corecție de referință

Setările de referință utilizate de software-ul CFX Manager™ Dx pot necesita să fie corectate pentru godeurile individuale ale testului [**Well Group** (Grup de godeuri)] în curs de analizare.

1. În fereastra Data Analysis (Analiza datelor), asigurați-vă că selectați **Well Group** (Grup de godeuri) al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5. Așadar, faceți clic pe meniul vertical **Well Group** (Grup de godeuri) de lângă butonul **Well Group** (Grup de godeuri) (consultați ilustrația 4) din bara de instrumente.
2. În partea stângă a ferestrei Data Analysis (Analiza datelor), bifați numai caseta de selectare **FAM** pentru canalul de detecție a adenovirusului țintă.

3. În bara de meniu a ferestrei Data Analysis (Analiza datelor), faceți clic pe **Settings** → **Baseline Threshold…** (Setări → Prag valoare de referință…) pentru a deschide caseta de dialog Baseline Threshold (Prag valoare de referință) (consultați ilustrația 5).
4. Faceți clic o dată pe simbolul ◊ din antetul coloanei **Baseline End** (Valoare finală a liniei de bază) pentru a sorta tabelul în ordinea crescătoare a valorilor **Baseline End** (Valoare finală a liniei de bază).
5. Selectați toate liniile care prezintă o valoare **Baseline End** (Valoare finală a liniei de bază) cuprinsă între 1 și 9 (consultați ilustrația 5).



Ilustr. 5: Caseta de dialog Baseline Threshold (Prag valoare de referință)

6. Setați valoarea în câmpul **End:** (Sfârșit:) la 45 pentru liniile selectate (consultați ilustrația 5).

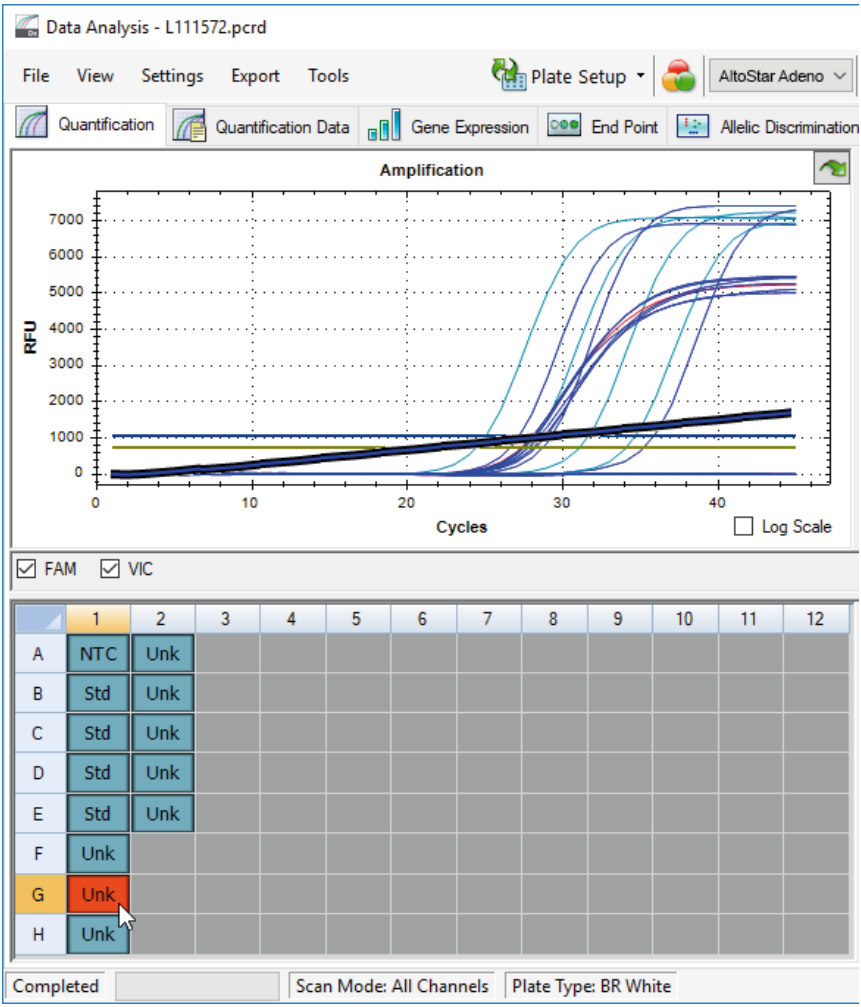
7. Confirmați setările făcând clic pe **OK**.
8. În partea stângă a ferestrei Data Analysis (Analiza datelor), debifați caseta de selectare **FAM** și bifați numai caseta de selectare **VIC** pentru canalul de detecție al target IC.
9. Repetați pașii 3-7 pentru canalul de detecție VIC™ (IC).

7.6.7.3 Excluderea semnalelor PCR neregulate

Rezultatele valide pot fi obținute doar din semnale PCR fără artefacte, care pot fi cauzate, de exemplu, de impurități sau bule în amestecul PCR. Semnalele PCR care conțin artefacte trebuie excluse de utilizator.

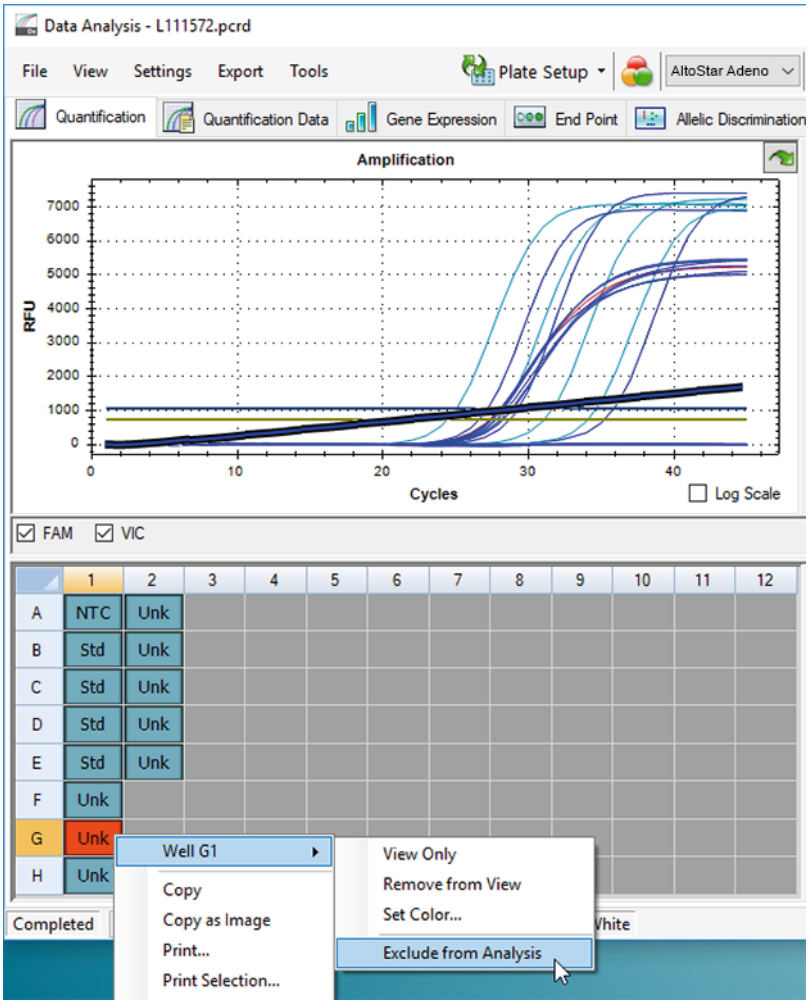
1. În fereastra Data Analysis (Analiza datelor), asigurați-vă că selectați **Well Group** (Grup de godeuri) al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5. Așadar, faceți clic pe meniul vertical **Well Group** (Grup de godeuri) de lângă butonul **Well Group** (Grup de godeuri) (consultați ilustrația 4) din bara de instrumente.

2. Identificați godeurile cu semnale PCR neregulate (creșterea semnalului liniar, vârfuri de semnal etc.) în oricare dintre canalele de detecție FAM™ (target Adenovirus) și VIC™ (IC) (consultați ilustrația 6).



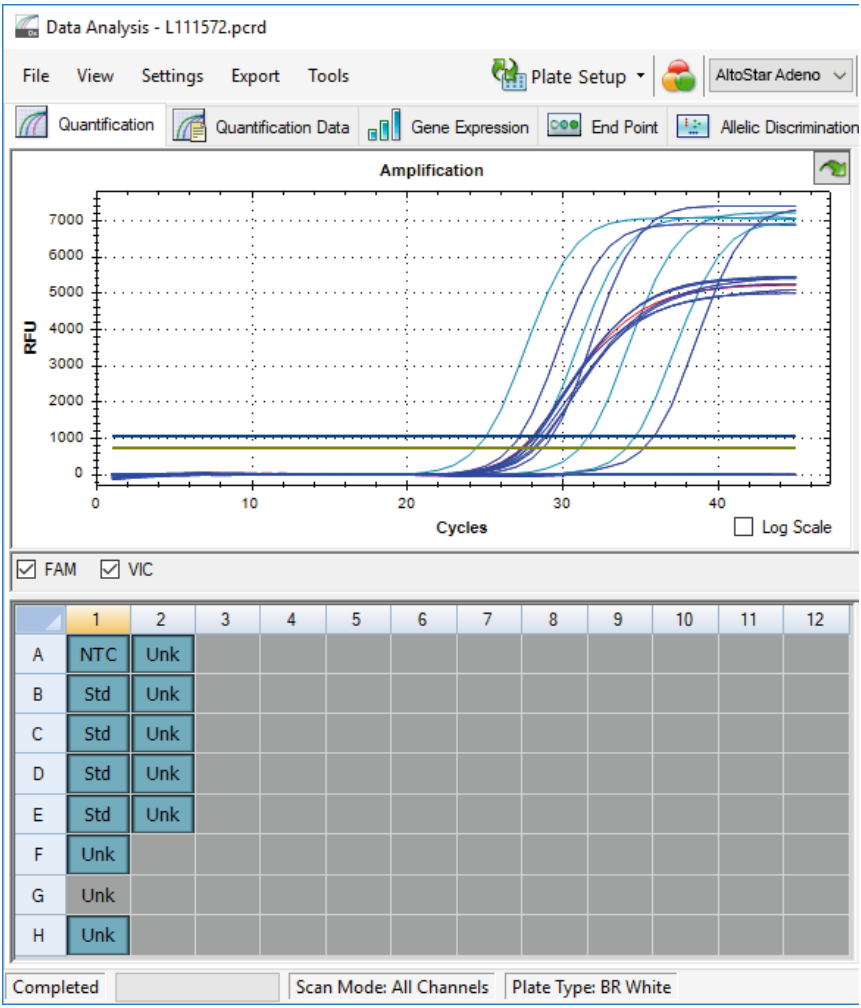
Ilustr. 6: Fereastra Data Analysis (Analiza datelor): semnal PCR neregulat

3. Faceți clic dreapta pe fiecare godeu afectat și selectați **Well... → Exclude from Analysis** (Godeu… → Excludere din analiză) (consultați ilustrația 7).



Ilustr. 7: Fereastra Data Analysis (Analiza datelor): excluderea godeului din analiză

4. Godeul selectat este exclus din analiză. Nu se vor genera rezultate pentru acest godeu (consultați ilustrația 8).



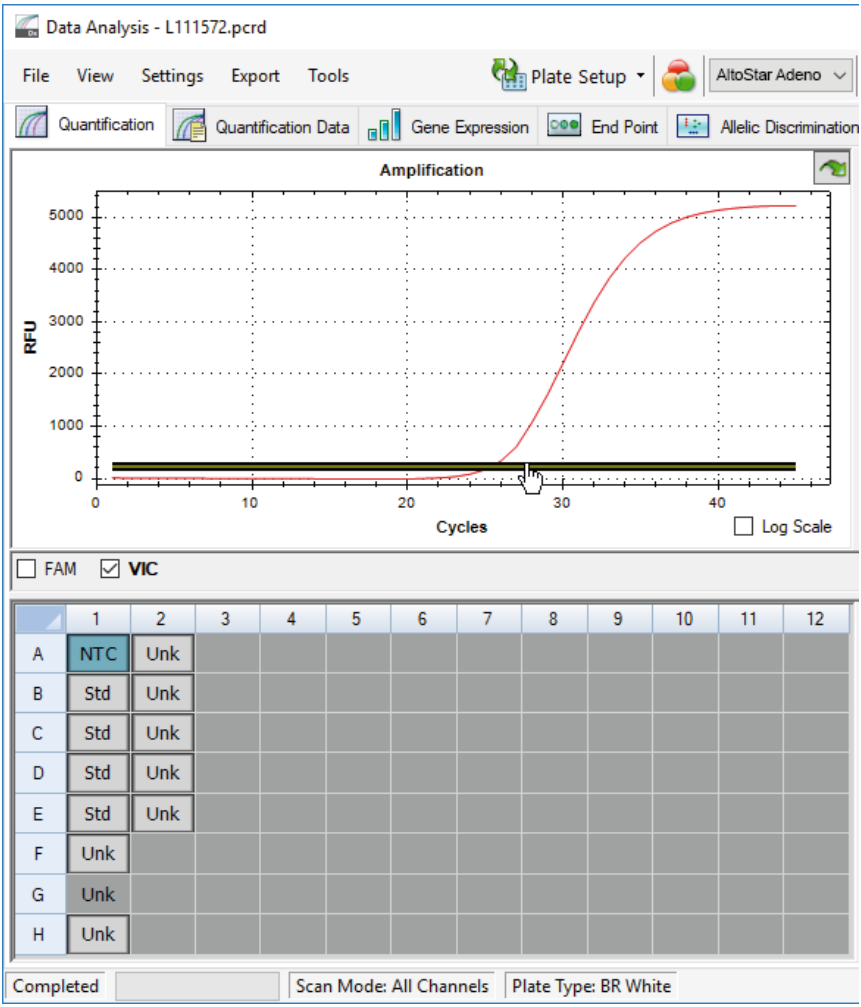
Ilustr. 8: Fereastra Data Analysis (Analiza datelor): godeu exclus

7.6.7.4 Setarea pragurilor

Pragurile pentru canalele de detecție FAM™ (target Adenovirus) și VIC™ (IC) trebuie setate manual de către utilizator conform semnalelor controalelor.

1. În fereastra Data Analysis (Analiza datelor), asigurați-vă că selectați **Well Group** (Grup de godeuri) al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5. Așadar, faceți clic pe meniul vertical **Well Group** (Grup de godeuri) de lângă butonul **Well Group** (Grup de godeuri) (consultați ilustrația 4) din bara de instrumente.

2. În partea stângă a ferestrei Data Analysis (Analiza datelor), activați doar caseta de selectare **VIC** pentru canalul de detecție al IC (consultați ilustrația 9).



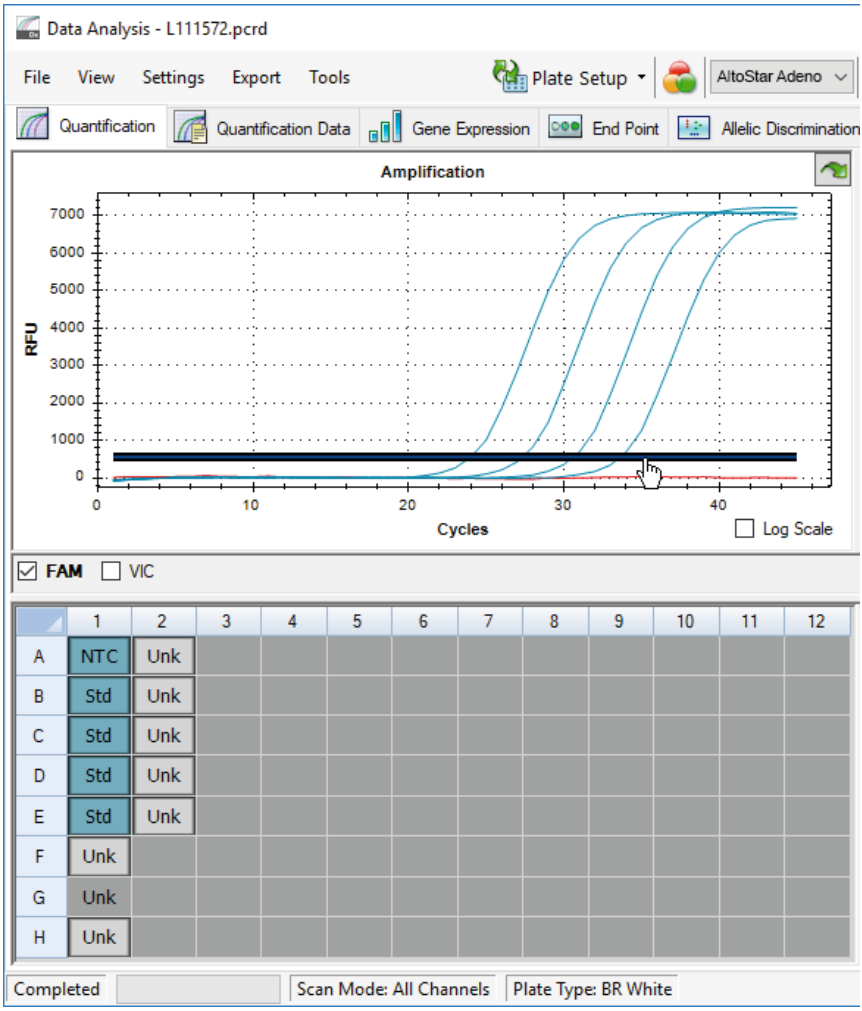
Ilustr. 9: Fereastra Data Analysis (Analiza datelor): setarea pragului VIC™

3. Selectați doar godeul NTC în vizualizarea plăcii din fereastra Data Analysis (Analiza datelor) (consultați ilustrația 9).
4. Trageți pragul în zona exponențială a semnalului NTC (consultați ilustrația 9).

NOTĂ

NTC conține șablonul IC, ceea ce duce la un semnal IC într-un godeu NTC valid.

5. În partea stângă a ferestrei Data Analysis (Analiza datelor), debifați caseta de selectare **VIC** și bifați caseta de selectare **FAM** pentru canalul de detecție a adenovirusului țintă (consultați ilustrația 10).



Ilustr. 10: Fereastra Data Analysis (Analiza datelor): setarea pragului FAM™

6. Selectați doar godeurile care conțin NTC și QS în vizualizarea plăcii din fereastra Data Analysis (Analiza datelor) (consultați ilustrația 10).
7. Trageți pragul bine deasupra semnalului NTC în zona exponențială a semnalelor QS (consultați ilustrația 10).

7.6.8 Validitatea rezultatelor PCR

7.6.8.1 Excluderea godeurilor care conțin date invalide

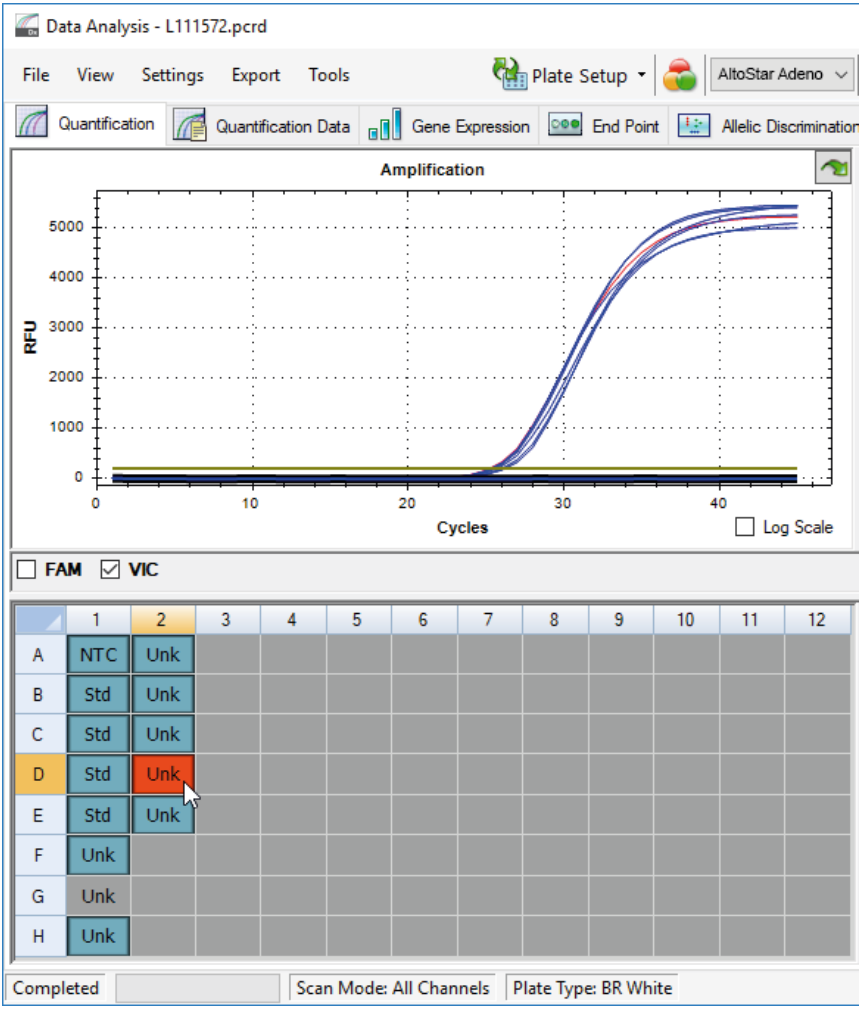
Godeurile care nu conțin date valide trebuie excluse din generarea rezultatelor de către utilizator.

1. În fereastra Data Analysis (Analiza datelor), asigurați-vă că selectați **Well Group** (Grup de godeuri) al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5. Așadar, faceți clic pe meniul vertical **Well Group** (Grup de godeuri) de lângă butonul **Well Group** (Grup de godeuri) (consultați ilustrația 4) din bara de instrumente.
2. Identificați toate godeurile care conțin date invalide. Un godeu este invalid dacă se aplică oricare dintre următoarele condiții:

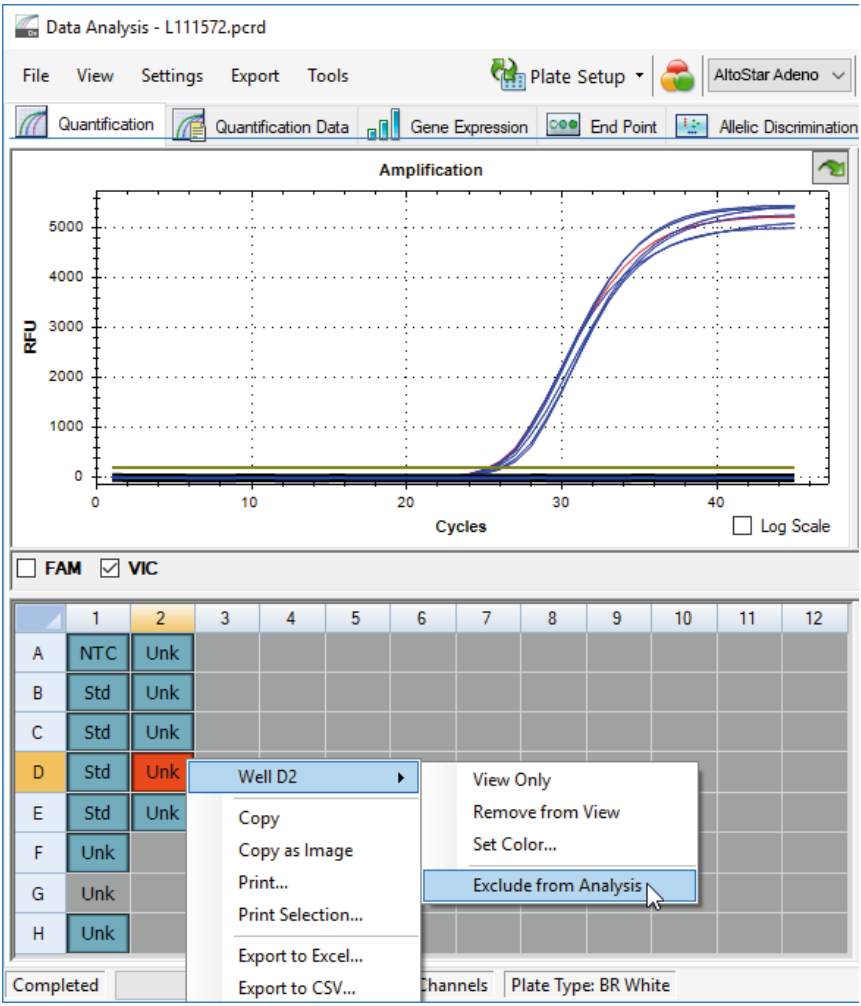
   a) Întregul ciclu este nevalid [consultați capitolele 7.6.8.2 Validitatea unui ciclu PCR diagnostic (calitativ) și 7.6.8.3 Validitatea unui ciclu PCR diagnostic (cantitativ)].

   b) Datele godeului nu respectă condițiile de control pentru un rezultat valid (consultați capitolul 7.6.8.4 Validitatea rezultatelor pentru o probă).

3. Faceți clic dreapta pe fiecare godeu care conține date nevalide conform capitolelor 7.6.8.2 Validitatea unui ciclu PCR diagnostic (calitativ) până la 7.6.8.4 Validitatea rezultatelor pentru o probă și selectați **Well... → Exclude from Analysis** (Godeu… → Excludere din analiză) (consultați ilustrațiile 11 și 12).



Ilustr. 11: Fereastra Data Analysis (Analiza datelor): godeu invalid



Ilustr. 12: Fereastra Data Analysis (Analiza datelor): excluderea godeului invalid din analiză

Godeul selectat este exclus din analiză. Nu se vor genera rezultate pentru acest godeu.

7.6.8.2 Validitatea unui ciclu PCR diagnostic (calitativ)

Un ciclu PCR diagnostic calitativ este considerat **valid** dacă sunt îndeplinite următoarele condiții de control:

Tabelul 8: Condiții de control pentru un ciclu PCR valid (calitativ)

Control	Canal de detecție	
	FAM™ (target Adenovirus)	VIC™ (IC)
QS	+	Nu se aplică
NTC	-	+

Un ciclu PCR diagnostic calitativ este **nevalid** dacă:

- Ciclul nu a fost finalizat.
- Cel puțin una dintre condițiile de control necesare pentru un ciclu PCR diagnostic calitativ valid nu este îndeplinită.

În cazul unui ciclu PCR de diagnosticare nevalid, excludeți toate godeurile din analiză și repetați ciclul AltoStar® începând cu probele originale.

7.6.8.3 Validitatea unui ciclu PCR diagnostic (cantitativ)

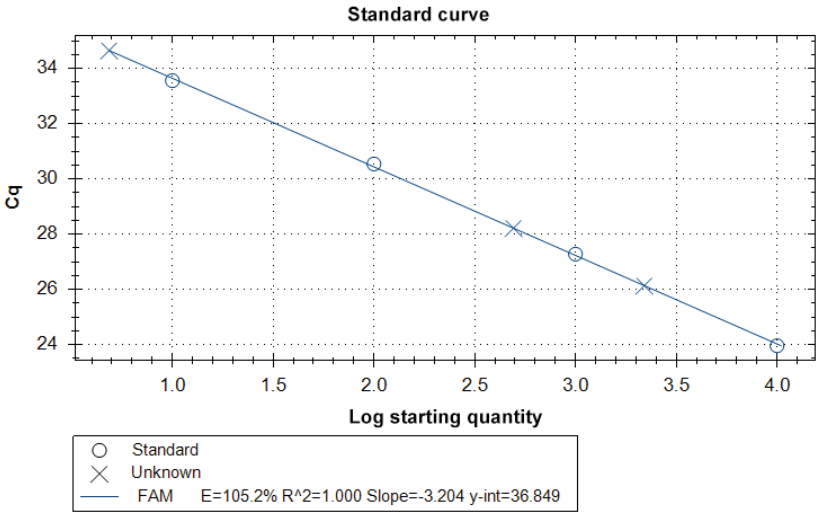
Un ciclu PCR diagnostic cantitativ este considerat **valid** dacă sunt îndeplinite următoarele condiții:

- Sunt îndeplinite toate condițiile de control pentru un ciclu PCR diagnostic calitativ valid [consultați capitolul 7.6.8.2 Validitatea unui ciclu PCR diagnostic (calitativ)].
- Curba standard generată atinge următoarea valoare a parametrului de control:

Tabelul 9: Parametru de control al curbei standard

Parametru de control	Valoare validă
R la pătrat (R^2)	≥ 0,98

Parametrul de control al curbei standard este afișat sub graficul Standard curve (Curbă standard) în fereastra Data Analysis (Analiza datelor) (consultați ilustrația 13).



Ilustr. 13: Date curbă standard

Un ciclu PCR diagnostic cantitativ este **nevalid** dacă:

- Ciclul nu a fost finalizat.
- Cel puțin una dintre condițiile de control necesare pentru un ciclu PCR diagnostic cantitativ valid nu este îndeplinită.

În cazul unui ciclu PCR diagnostic nevalid, excludeți toate godeurile din analiză și repetați ciclul AltoStar® începând de la probele originale.

7.6.8.4 Validitatea rezultatelor pentru o probă

Rezultatul pentru o probă individuală este **nevalid** dacă semnalele din canalul de detecție VIC™ (IC) și din canalul de detecție FAM™ (target Adenovirus) sunt negative (consultați tabelul 10). În cazul unui rezultat invalid pentru o probă, excludeți godeul din analiză și repetați testarea probei inițiale sau recoltați și testați o probă nouă.

Tabelul 10: Validitatea rezultatului

Canal de detecție		Validitatea rezultatului
FAM™ (target Adenovirus)	VIC™ (IC)	
+	+	Rezultat valid
+	-	Rezultat valid*
-	+	Rezultat valid
-	-	**Rezultat invalid**

* Detecția IC nu este necesară atunci când adenovirusul țintă este detectat. O încărcătură ridicată de ADN pentru adenovirus în probă poate duce la un semnal IC redus sau absent.

7.6.9 Exportul rezultatelor PCR pentru interpretarea realizată de LIMS

Pentru ca rezultatele ciclului PCR să fie disponibile unui sistem LIMS conectat, în vederea interpretării rezultatelor realizată de LIMS, acestea trebuie exportate sub forma unui fișier cu rezultate LIMS (.CSV).

1. În fereastra Data Analysis (Analiza datelor), asigurați-vă că selectați **Well Group** (Grup de godeuri) pentru setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5. Așadar, faceți clic pe meniul vertical **Well Group** (Grup de godeuri) de lângă butonul **Well Group** (Grup de godeuri) (consultați ilustrația 4) din bara de instrumente.
2. Asigurați-vă că toate etapele procesului de analiză (consultați capitolul 7.6.7.2 Corecție de referință până la 7.6.8.1 Excluderea godeurilor care conțin date nevalide) au fost finalizate pentru grupul de godeuri al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5.

3. În bara de meniu a ferestrei Data Analysis (Analiza datelor), faceți clic pe **Export** (Exportare) → **Export All Data Sheets** (Exportarea tuturor fișelor de date) pentru a deschide caseta de dialog Browse For Folder (Căutare folder).
4. În caseta de dialog Browse For Folder (Căutare folder), specificați locația în care vor fi generate fișierele cu rezultatele LIMS și faceți clic pe **OK**.

NOTĂ

Integrarea în LIMS trebuie implementată în conformitate cu specificațiile altona Diagnostics. Pentru informații privind integrarea în LIMS, consultați capitolul 17. Protocol de testare pentru AltoStar® Connect software și informații pentru integrarea în LIMS și/sau contactați asistența tehnică altona Diagnostics (consultați capitolul 12. Asistență tehnică).

NOTĂ

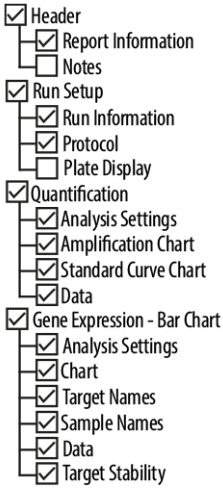
Salvarea rezultatelor mai multor teste (grup de godeuri) dintr-un ciclu PCR în același folder duce la înlocuirea fișierelor cu rezultatele LIMS ale primului test (grup de godeuri) cu fișierele cu rezultatele LIMS ale celui de-al doilea test (grup de godeuri). În acest caz, fișierele cu rezultatele LIMS ale primului test (grup de godeuri) pot fi exportate din nou.

7.6.10 Exportul rezultatelor PCR pentru interpretarea manuală a rezultatelor

Dacă rezultatele nu sunt transmise către un sistem LIMS pentru interpretarea de către LIMS, acestea trebuie interpretate manual de către utilizator. În acest scop, rezultatele analizei fiecărui test (grup de godeuri) trebuie exportate sub forma unui raport.

1. În fereastra Data Analysis (Analiza datelor), asigurați-vă că selectați **Well Group** (Grup de godeuri) pentru setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5. Așadar, faceți clic pe meniul vertical **Well Group** (Grup de godeuri) de lângă butonul **Well Group** (Grup de godeuri) (consultați ilustrația 4) din bara de instrumente.
2. În partea stângă a ferestrei Data Analysis (Analiza datelor), bifați casetă de selectare **VIC**, precum și casetă de selectare **FAM**.

3. Asigurați-vă că toate etapele procesului de analiză (consultați capitolul 7.6.7.2 Corecție de referință până la 7.6.8.1 Excluderea godeurilor care conțin date invalide) au fost finalizate pentru grupul de godeuri al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5.
4. În bara de meniu a ferestrei Data Analysis (Analiza datelor), faceți clic pe **Tools → Reports...** (Instrumente → Rapoarte...) pentru a deschide caseta de dialog Report (Raport).
5. Asigurați-vă că cel puțin următorul conținut este selectat pentru generarea raportului în partea stângă sus a casetei de dialog Report (Raport) (consultați ilustrația 14):



Ilustr. 14: Caseta de dialog Report (Raport)

6. Selectați sau deselectați conținutul suplimentar al raportului bifând casetele de selectare corespunzătoare, după cum este necesar.
7. În bara de meniu a casetei de dialog Report (Raport), faceți clic pe **File → Save As...** (Fișier → Salvare ca...) pentru a deschide caseta de dialog Save Report (Salvare raport).
8. În caseta de dialog Save Report (Salvare raport), specificați numele și locația fișierului raportului care urmează să fie generat și faceți clic pe **Save** (Salvare).

7.6.10.1 Interpretarea manuală a rezultatelor

1. Deschideți fișierul de raport generat pentru grupul de godeuri al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 (consultați capitolul 7.6.10 Exportul rezultatelor PCR pentru interpretarea manuală a rezultatelor).
2. Consultați tabelul Quantification Data (Date de cuantificare) din raport (consultați ilustrația 15). Tabelul cuprinde 2 rânduri pentru fiecare **Sample** (Probă) – unul pentru ținta **Target** *Adenovirus* și unul pentru ținta **Target** *Internal Control* (Control intern).

Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Biological Set Name	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Starting Quantity (SQ)	Log Starting Quantity	SQ Mean	SQ Std. Dev	Well Note
A01	FAM	Adenovirus	NTC	NTC | 101208051910	AltoStar AdenovirusPCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00	
A02	FAM	Adenovirus	Unkn	Sample 4 | 00000004	AltoStar AdenovirusPCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 copies/ml
B01	FAM	Adenovirus	Std	Adenovirus QS1 | 101038051910	AltoStar AdenovirusPCR Kit 1.5	23.97	23.97	0.000	1.000E+04	4.000	1.00E+04	0.00E+00	
B02	FAM	Adenovirus	Unkn	Sample 5 | 00000005	AltoStar AdenovirusPCR Kit 1.5	34.65	34.65	0.000	4.855E+00	0.686	4.85E+00	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 copies/ml
C01	FAM	Adenovirus	Std	Adenovirus QS2 | 101048051910	AltoStar AdenovirusPCR Kit 1.5	27.28	27.28	0.000	1.000E+03	3.000	1.00E+03	0.00E+00	
C02	FAM	Adenovirus	Unkn	Sample 6 | 00000006	AltoStar AdenovirusPCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 copies/ml
D01	FAM	Adenovirus	Std	Adenovirus QS3 | 101058051910	AltoStar AdenovirusPCR Kit 1.5	30.54	30.54	0.000	1.000E+02	2.000	1.00E+02	0.00E+00	
E01	FAM	Adenovirus	Std	Adenovirus QS4 | 101068051910	AltoStar AdenovirusPCR Kit 1.5	33.56	33.56	0.000	1.000E+01	1.000	1.00E+01	0.00E+00	
E02	FAM	Adenovirus	Unkn	Sample 8 | 00000008	AltoStar AdenovirusPCR Kit 1.5	28.22	28.22	0.000	4.924E+02	2.692	4.92E+02	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 copies/ml
F01	FAM	Adenovirus	Unkn	Sample 1 | 00000001	AltoStar AdenovirusPCR Kit 1.5	26.14	26.14	0.000	2.195E+03	3.341	2.20E+03	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 copies/ml
H01	FAM	Adenovirus	Unkn	Sample 3 | 00000003	AltoStar AdenovirusPCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 copies/ml
A01	VIC	Internal Control	NTC	NTC | 101208051910	AltoStar AdenovirusPCR Kit 1.5	25.27	25.27	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	
A02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 4 | 00000004	AltoStar AdenovirusPCR Kit 1.5	26.08	26.08	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 copies/ml
B02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 5 | 00000005	AltoStar AdenovirusPCR Kit 1.5	25.46	25.46	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 copies/ml
C02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 6 | 00000006	AltoStar AdenovirusPCR Kit 1.5	25.33	25.33	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 copies/ml
E02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 8 | 00000008	AltoStar AdenovirusPCR Kit 1.5	26.25	26.25	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 copies/ml
F01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 1 | 00000001	AltoStar AdenovirusPCR Kit 1.5	25.45	25.45	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 copies/ml
H01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 3 | 00000003	AltoStar PCR Kit 1.5	25.70	25.70	0.000	N/A	N/A	N/A	0.00E+00	Concentration factor: 160.00 copies/ml

Ilustr. 15: Raport: Quantification Data (Date de cuantificare)

Rezultatele calitative sunt marcate prin termenul *qualitative* (calitativ) în coloana **Well Note** (Notă referitoare la godeu) din tabelul Quantification Data (Date de cuantificare).

3. Identificați fiecare rând corespunzător țintei **Target** *Adenovirus* și marcat cu termenul *qualitative* (calitativ) în coloana **Well Note** (Notă referitoare la godeu).
4. În aceste rânduri, consultați coloana $\mathbf{C_q}$ pentru rezultatul probei respective **Sample** (Probă).

5. Consultați tabelul 11 pentru interpretarea rezultatelor calitative.

Tabelul 11: Rezultate calitative: interpretarea rezultatelor

Ciclul de prag (C_q) al target Adenvirus	Interpretarea rezultatului
1–45	ADN specific pentru HAdV detectat.
N/A	Nu a fost detectat niciun ADN specific pentru HAdV. Proba nu conține cantități detectabile de ADN specifică HAdV.

Rezultatele cantitative sunt marcate cu un *Concentration factor* (Factor de concentrare) în coloana **Well Note** (Notă referitoare la godeu) din tabelul Quantification Data (Date de cuantificare) (consultați ilustrația 15).

6. Identificați fiecare rând corespunzător țintei **Target** *Adenovirus* și marcat cu un *Concentration factor* (Factor de concentrare) în coloana **Well Note** (Notă referitoare la godeu).
7. În aceste rânduri, consultați coloana **Starting Quantity (SQ)** [Cantitate inițială (CI)] pentru concentrația adenovirusului țintă măsurată în eluatul pentru **Sample** (Proba) respectivă. Pentru a calcula rezultatul pentru proba inițială a pacientului, valoarea **Starting Quantity (SQ)** [Cantitate inițială (CI)] trebuie înmulțită de utilizator cu *Concentration factor* (Factorul de concentrare) corespunzător (inclusiv unitatea).
8. Consultați tabelul 12 pentru interpretarea rezultatelor cantitative.

Tabelul 12: Rezultate cantitative: interpretarea rezultatelor

Starting Quantity (SQ) [Cantitate inițială (CI)] a target Adenovirus	Interpretarea rezultatului
> 0	ADN specific pentru HAdV detectat. Înmulțiți valoarea **Starting Quantity (SQ)** [Cantitate inițială (CI)] cu *Concentration factor* (Factor de concentrare) din coloana **Well Note** (Notă referitoare la godeu) (inclusiv unitatea) pentru a calcula concentrația probei inițiale a pacientului.

Starting Quantity (SQ) [Cantitate inițială (CI)] a target Adenovirus	Interpretarea rezultatului
N/A	Nu a fost detectat niciun ADN specific pentru HAdV. Proba nu conține cantități detectabile de ADN specifică HAdV.

7.6.11 Analiza datelor PCR și interpretarea automată a rezultatelor utilizând software-ul FastFinder Standalone

Opțional, analiza datelor PCR și interpretarea automată a rezultatelor pot fi realizate utilizând software-ul FastFinder Standalone și pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5. Versiunea validă a pluginului de testare este menționată în capitolul 3.2 Pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5.

Pentru informații suplimentare privind software-ul FastFinder Standalone, consultați instrucțiunile de utilizare corespunzătoare.

NOTĂ

Pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 este destinat utilizării ca ajutor pentru interpretarea rezultatelor generate cu setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 pe sistemul CFX96™ DW Dx. Toate rezultatele generate cu pluginul de testare trebuie verificate, din punct de vedere al validității și corectitudinii, de către un operator uman.

1. Porniți aplicația FastFinder Standalone pe PC-ul cu sistemul AltoStar® Automated Analysis.
2. Introduceți datele de utilizator și parola pentru autentificare. Se va afișa ecranul de pornire. Pot fi accesate toate analizele deschise și autorizate.
3. Faceți clic pe **Create new analysis** (Creare analiză nouă).
4. Navigați la fișierul de date care urmează să fie analizat și selectați-l făcând clic pe **Open** (Deschidere). Sunt acceptate numai fișierele cu extensia .PCRD. Fișierul este încărcat și analizat. După finalizarea analizei, este afișat mesajul **Ready for review** (Gata pentru examinare).

NOTĂ

Se recomandă insistent să se analizeze un singur fișier de date PCR (.PCRD) la un moment dat, nu mai multe cicluri PCR în paralel.

5. Faceți clic pe ciclul PCR pentru a începe procesul de examinare.
6. Verificați controalele și soluționați eventualele mesaje de eroare pe baza avertismentelor aferente probelor individuale.

NOTĂ

Asigurați-vă că probele pentru care nu se poate obține un rezultat valid sunt marcate ca neconcludente și sunt supuse unei noi extracții și retestări.

7. Autorizați sau reporniți analiza.

După ce faceți clic pe **Authorize** (Autorizare), analiza este descărcată automat sub formă de fișier .CSV. Pentru analizele autorizate se pot descărca fișiere PDF. Faceți clic pe butonul **Actions** (Acțiuni) din colțul din dreapta sus și selectați **Generate PDF Export** (Generare export PDF). Accesați **Downloads** (Descărcări) din același meniu pentru a deschide fișierul.

8. Utilizarea setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 cu instrumente PCR în timp real diferite de CFX96™ Deep Well Dx System

Setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 a fost validat pentru utilizare atât pe sistemul CFX96™ DW Dx, cât și pe alte instrumente PCR în timp real (consultați capitolul 5.3.2 Alte fluxuri de lucru). Următoarele capitole, 8.1 Materiale și dispozitive necesare, dar care nu sunt furnizate și 8.2 Procedură, descriu modul de utilizare a setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 împreună cu aceste instrumente.

8.1 Materiale și dispozitive necesare, dar care nu sunt furnizate

Sunt necesare următoarele instrumente, software și materiale:

- Materiale și dispozitive generale (consultați capitolul 7.5 Materiale și dispozitive generale)
- CFX96™ Deep Well Dx System și software-ul CFX Manager™ Dx versiunea 3.1 (Bio-Rad)
    - Plăci PCR cu 96 de godeuri și folie de sigilare (pentru detalii, consultați tabelul 3)
- CFX96™ Dx System și software-ul CFX Manager™ Dx versiunea 3.1 (Bio-Rad)
    - Plăci PCR cu 96 de godeuri și folie de sigilare (pentru detalii, consultați tabelul 3)
- Rotor-Gene® Q 5/6 plex Platform și software-ul Rotor-Gene® Q versiunea 2.3.1 (QIAGEN)
    - Benzi de tuburi de 0,1 ml și capace [STRIP Tubes 0.1 ml pentru cicloare Rotor-Gene® (LTF Labortechnik) sau echivalent]
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System și software-ul QuantStudio™ 5 Dx v1.0.2 și ABI Prism® 7500 SDS și software-ul 7500 v2.3 (Applied Biosystems)
    - Plăci PCR cu 96 de godeuri și folie de sigilare [MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate și MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems) sau echivalent]
- LightCycler® 480 Instrument II și software-ul LightCycler® 480 versiunea 1.5.1 (Roche)
    - Plăci PCR cu 96 de godeuri și folie de sigilare [LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white și LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche) sau echivalent]

NOTĂ

Nu se recomandă utilizarea altor materiale sau dispozitive, diferite de cele specificate în aceste instrucțiuni de utilizare.

8.2 Procedură

8.2.1 Pregătirea probei

Setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 a fost validat utilizând sistemul de automatizare AltoStar® AM16 în combinație cu setul AltoStar® Purification Kit 1.5.

Setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 trebuie utilizat împreună cu un control intern heterolog (setul AltoStar® Internal Control 1.5), care permite monitorizarea procedurii de pregătire a probei (extracția acizilor nucleici), precum și a etapei ulterioare de PCR.

Volumul de control intern (IC) adăugat la amestecul probă/tampon de liză depinde de volumul de eluție. Acesta reprezintă 50 % din volumul de eluție.

ATENȚIE

Depozitarea eluaților în condiții necorespunzătoare poate duce la degradarea secvenței țintă de HAdV și poate compromite performanța produsului.

8.2.2 Configurarea amestecului master mix

Toate componentele setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 și probele trebuie dezghețate complet, omogenizate (prin pipetare sau agitare ușoară) și centrifugate scurt înainte de utilizare. Pregătiți amestecul master mix conform următoarei scheme de pipetare:

Tabelul 13: Schema de pipetare (pregătirea amestecului master mix)

Număr de reacții (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Volum master mix	**20 µl**	**240 µl**

ATENȚIE

Nu utilizați volume diferite de Master A și Master B pentru prepararea amestecului master mix față de cele specificate în aceste instrucțiuni de utilizare, deoarece acest lucru poate compromite performanța produsului.

ATENȚIE

Lipsa centrifugării componentelor produsului după dezghețare poate cauza contaminarea cu reziduuri de reactivi din capace și poate compromite performanța produsului.

8.2.3 Configurarea reacției

1. Pipetați 20 µl din amestecul master mix în fiecare godeu necesar al unei plăci PCR optice cu 96 de godeuri adecvate sau într-un tub de reacție optic adecvat.
2. Adăugați 10 µl din probă (eluat obținut în urma extracției acizilor nucleici) sau 10 µl din controale (QS1-4 sau NTC).

Tabelul 14: Schema de pipetare (configurarea reacției)

Configurarea reacției	
Amestec master mix	20 µl
Probă sau control	10 µl
Volum total	**30 µl**

3. Asigurați-vă că, pentru analiza cantitativă, sunt utilizate QS1-4 și 1 NTC. Pentru analiza calitativă, asigurați-vă că sunt utilizate cel puțin QS4 și 1 NTC.

4. Omogenizați bine probele și controalele cu amestecul master mix prin pipetare în sus și în jos.
5. Închideți placa PCR cu 96 de godeuri cu o folie de sigilare pentru plăci PCR și tuburile de reacție cu capace adecvate (consultați capitolul 8.1 Materiale și dispozitive necesare, dar care nu sunt furnizate).
6. Centrifugați placa PCR cu 96 de godeuri într-o centrifugă prevăzută cu rotor pentru plăci de microtitrare timp de 30 de secunde la aproximativ 1.000 × g (~3.000 rpm).

NTC conține întotdeauna matricea IC în concentrația corectă.

După finalizarea configurării reacției PCR, mixul PCR este stabil la temperatura camerei (max. +30 °C) timp de 30 de minute.

ATENȚIE

Nu depășiți durata de depozitare a amestecului PCR, deoarece acest lucru ar putea compromite performanța produsului.

ATENȚIE

Nu încurcați probele sau codurile de identificare ale probelor în timpul pregătirii reacției PCR sau al transferului în instrumentul PCR. Acest lucru poate duce la rezultate fals pozitive sau fals negative, ca urmare a atribuirii incorecte a probelor.

8.2.4 Ciclu PCR

8.2.4.1 Programarea instrumentului PCR în timp real

Pentru informații generale privind configurarea și programarea diferitelor instrumente PCR în timp real, consultați instrucțiunile de utilizare ale instrumentului respectiv.

Pentru instrucțiuni detaliate privind programarea utilizării setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 pe instrumente PCR în timp real specifice, contactați serviciul de asistență tehnică al altona Diagnostics (consultați capitolul 12. Asistență tehnică).

8.2.4.2 Setări ciclu

Definiți următoarele setări de bază:

Tabelul 15: Setări ciclu

Setări	
Volum reacție	30 µl
Viteză de variație	Implicit
Referință pasivă*	ROX™

* Dacă se aplică

Definiți următorii detectori de fluorescență (coloranți):

Tabelul 16: Detectori de fluorescență

Target	Denumire detector	Raportor	Moleculă de stingere a fluorescenței
HAdV	HAdV	FAM™	(Nu se aplică)
IC	Internal Control	JOE™	(Nu se aplică)

Definiți următorul profil de temperatură și achiziție a semnalului fluorescent:

Tabelul 17: Profil de temperatură și achiziție a colorantului fluorescent

	Etapă	Repetări ciclu	Achiziție	Temperatură [°C]	Timp [min:s]
Denaturare	Menținere	1	-	95	02:00
Amplificare	Cicluri	45	-	95	00:15
			Da	58	00:45
			-	72	00:15

ATENȚIE

Nu utilizați alte succesiuni ale ciclurilor decât cele specificate în prezentele instrucțiuni de utilizare, deoarece acest lucru poate compromite performanța produsului.

8.2.5 Analiza datelor

Pentru informații generale privind analiza datelor pe instrumente PCR în timp real specifice, consultați instrucțiunile de utilizare ale instrumentului respectiv.

Pentru instrucțiuni detaliate privind analiza datelor generate cu setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 pe diferite instrumente PCR în timp real, contactați serviciul de asistență tehnică al altona Diagnostics (consultați capitolul 12. Asistență tehnică).

Criteriile privind validitatea ciclurilor PCR diagnostice și interpretarea rezultatelor, indiferent de instrumentul PCR în timp real utilizat, sunt descrise în capitolele 7.6.8.2 Validitatea unui ciclu PCR diagnostic (calitativă) până la 7.6.8.4 Validitatea rezultatelor pentru o probă, în capitolul 7.6.10.1 Interpretarea manuală a rezultatelor, precum și în Tabelele 11 și 12.

NOTĂ

Concentrația „probei” este afișată în copii/µl și se referă la concentrația din eluat.

Pentru determinarea **încărcăturii virale a probei inițiale**, trebuie aplicată următoarea formulă:

$$\text{Încărcătură virală (\textbf{Probă}) [copii/ml]} = \frac{\text{Volum (\textbf{Eluat}) [µl]} \cdot \text{Încărcătură virală (\textbf{Eluat}) [copii/µl]}}{\text{Probă introdusă [ml]}}$$

ATENȚIE

Nu utilizați alte setări de control pentru analiza datelor decât cele specificate în prezentele instrucțiuni de utilizare, deoarece acest lucru poate duce la rezultate incorecte ale examinării IVD.

ATENȚIE

Ca în cazul oricărui test de diagnosticare, rezultatele trebuie interpretate ținând cont de toate rezultatele clinice și de laborator.

9. Date de performanță

Performanța setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 a fost evaluată utilizând primul Standard internațional al OMS privind ADN specific pentru adenovirusul uman, destinat tehnicilor de amplificare a acizilor nucleici (cod NIBSC: 16/324), precum și material de HAdV disponibil pe piață.

Datele de performanță au fost obținute utilizând setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 în cadrul AltoStar® Workflow (flux de lucru). Performanțe echivalente în ceea ce privește specificitatea, sensibilitatea și precizia au fost demonstrate și pentru celelalte instrumente PCR în timp real enumerate în capitolul 5.3.2 Alte fluxuri de lucru.

9.1 Plasmă

9.1.1 Sensibilitate analitică

Pentru determinarea limitei de detecție (LD), a fost generată o serie de diluții în plasmă a materialului HAdV disponibil pe piață, cuprinsă între 1,00E+04 și 1,00E+00 copii/ml.

Fiecare diluție a fost testată în 8 replici în 3 cicluri diferite (total n = 24 per diluție) utilizând combinații de:

- 3 loturi AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5
- 3 loturi AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 loturi AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 instrumente AltoStar® AM16
- 3 instrumente CFX96™ DW Dx

Datele din toate ciclurile au fost combinate și s-a efectuat o analiză probit pentru a determina valoarea LD de 95 %.

Tabelul 18: Rezultatele PCR utilizate pentru calcularea sensibilității analitice a setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5

Concentrație [copii/ml]	N [total]	N [pozitive]	Rată de succesiune [%]
1,00E+04	24	24	100
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
7,50E+02	24	24	100
5,00E+02	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,50E+02	24	24	100
5,00E+01	24	15	63
2,00E+01	24	10	42
1,00E+01	24	2	8
5,00E+00	24	3	13
1,00E+00	24	0	0

LD a setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 pentru detectarea HAdV în plasmă este de 141 copii/ml (interval de încredere 95 %: 92-271 copii/ml).

9.1.2 Specificitate analitică

Specificitatea analitică a setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 este asigurată prin selecția riguroasă a oligonucleotidelor (primeri și sonde). Oligonucleotidele au fost verificate prin analiza comparativă a secvențelor cu secvențele disponibile public, pentru a garanta că toate genotipurile HAdV relevante vor fi detectate.

Pentru verificarea specificității analitice a setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 au fost efectuate următoarele experimente (consultați capitolele 9.1.2.1 Probe negative până la 9.1.2.3 Reactivitate încrucișată).

9.1.2.1 Probe negative

Au fost testate 33 de probe de plasmă negative pentru HAdV, provenite de la donatori individuali, utilizând setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5. Toate probele (33 din 33) au fost testate cu rezultat negativ pentru ADN-ul specific HAdV și pozitiv pentru IC. Specificitatea analitică a setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 pentru probele de plasmă este ≥ 95 %.

9.1.2.2 Substanțe interferente

Pentru a evalua influența substanțelor endogene și exogene cu potențial de interferență asupra performanței setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5, substanțele selectate au fost adăugate în probe de plasmă. Aceste probe de plasmă conțineau HAdV într-o concentrație de 3 x LD (4,23E+02 copii/ml), 1,00E+04 copii/ml și, respectiv, zero HAdV.

Rezultatele obținute pentru probele care conțineau substanțe potențial interferente au fost comparate cu rezultatele generate pentru probele de plasmă care nu conțineau substanțe interferente adăugate. Fiecare probă a fost prelucrată în 3 replici.

Nu s-au observat interferențe pentru probele care conțineau niveluri ridicate de:

- Substanțe endogene
  - Bilirubină
  - Hemoglobină
  - ADN genomic uman
  - Albumină serică umană
  - Trigliceride
- Substanțe exogene
  - Azatioprină
  - Ciclosporină
  - Foscarnet
  - Ganciclovir

ATENȚIE

Prezența inhibitorilor PCR (de exemplu, heparina) ar putea determina rezultate fals negative sau invalide.

9.1.2.3 Reactivitate încrucișată

Specificitatea analitică a setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 în ceea ce privește reactivitatea încrucișată cu alți agenți patogeni decât HAdV a fost evaluată prin testarea:

- Virusurilor asociate cu HAdV
- Virusurilor care provoacă simptome similare cu cele ale unei infecții cu HAdV
- Virusurilor care pot fi prezente la pacienții care suferă de o infecție cu HAdV

Setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 nu a prezentat reacții încrucișate cu niciunul dintre următorii agenți patogeni:

- Virusul BK (BKV)
- Citomegalovirus (CMV)
- Virusul Epstein-Barr (EBV)
- Virusul hepatitei A (HAV)
- Virusul hepatitei B (HBV)
- Virusul hepatitei C (HCV)
- Virusul herpes simplex 1 (HSV-1)
- Virusul herpes simplex 2 (HSV-2)
- Virusul herpetic uman tip 6A (HHV-6A)
- Virusul herpetic uman tip 6B (HHV-6B)
- Virusul imunodeficienței umane 1 (HIV-1)
- Virusul JC (JCV)
- Parvovirusul B19
- Virusul varicelo-zosterian (VZV)

ATENȚIE

În cazul în care proba conține alți agenți patogeni în afară de HAdV, poate apărea o competiție cu amplificarea targetului sau reacții încrucișate, ceea ce poate duce la rezultate incorecte ale examinării IVD.

9.1.3 Reactivitate

Specificitatea setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 în ceea ce privește detectarea diferitelor specii de HAdV este asigurată în primul rând prin selecția primerilor și a sondelor. Adenovirusurile sunt clasificate în 7 specii (A, B, C, D, E, F și G). Adenovirusul 14 (ADV-14), care aparține speciei B, a fost utilizat pentru generarea datelor de performanță pentru setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5. Pentru a verifica dacă setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 permite detectarea și cuantificarea altor adenovirusuri decât ADV-14, cu setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 a fost testat câte un tip de adenovirus din fiecare dintre speciile A, C, D, E, F și G (consultați tabelul 19).

Tabelul 19: Specii de HAdV testate

Tip	Specie
Adenovirus 31	A
Adenovirus 1	C
Adenovirus 27	D
Adenovirus 4	E
Adenovirus 41	F
Adenovirus 52	G

ATENȚIE

Mutațiile potențiale din regiunile target ale genomului de HAdV acoperite de primerii și/sau sondele utilizate în set pot duce la subcuantificare și/sau la eșecul detectării prezenței agentului patogen.

9.1.4 Interval liniar

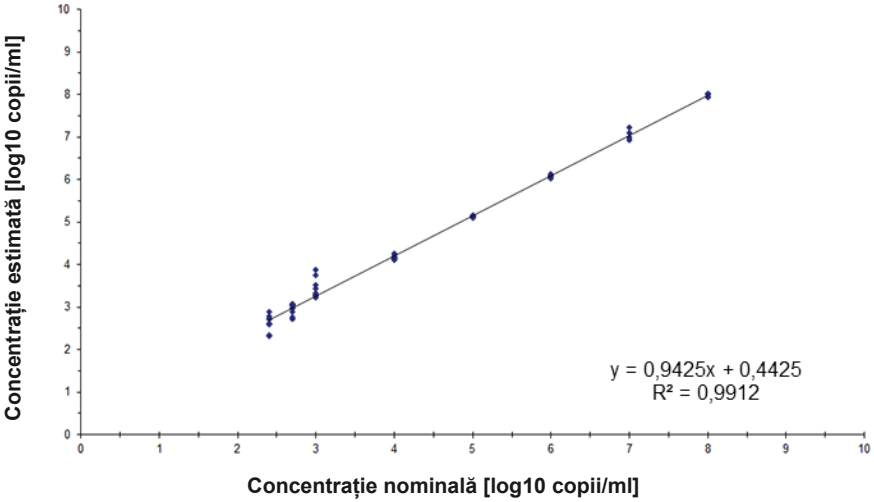
Pentru determinarea intervalului liniar al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 a fost testată o serie de diluții de HAdV în plasmă cuprinsă între 1,00E+08 și 2,00E+02 copii/ml:

- Diluțiile cu o concentrație cuprinsă între 1,00E+08 și 1,00E+06 copii/ml au fost testate în 4 replici.
- Diluțiile cu o concentrație cuprinsă între 1,00E+05 și 2,00E+02 copii/ml au fost testate în 8 replici.

Analiza a fost efectuată pe baza unei regresii polinomiale.

Intervalul liniar al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 pentru cuantificarea HAdV în plasmă este 2,50E+02-1,00E+08 copii/ml. Reprezentarea grafică a datelor este prezentată în ilustrația 16.

Concentrația estimată log10 comparativ cu concentrația nominală log10 a setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5



Ilustr. 16: Analiza de regresie liniară a setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 cu probe de plasmă

9.1.5 Precizie

Precizia setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 a fost evaluată utilizând un grup format din:

- 1 probă de plasmă pozitivă cu valori înalte de HAdV (1,00E+04 UI/ml echivalent cu 8,00E+03 copii/ml)
- 1 probă de plasmă pozitivă cu valori scăzute de HAdV [1,50E+03 UI/ml echivalent cu 1,20E+03 copii/ml (5 x limita inferioară de cuantificare (LIC))]
- 1 probă de plasmă negativă pentru HAdV

Datele au fost determinate pe baza:

- Valorilor de cuantificare pentru proba pozitivă cu valori scăzute de HAdV
- Valorilor ciclului de prag (C_q*) pentru IC din proba negativă de HAdV

* Vă rugăm să rețineți că termenul ales C_q este echivalent cu denumirea C_t, care poate fi utilizată de alte ciclatoare decât CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad).

Datele privind repetabilitatea au fost generate în conformitate cu recomandările din ghidul CLSI EP05-A3 [„Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition" (Evaluarea preciziei procedurilor de măsurare cantitativă; Ghid aprobat — Ediția a treia)] [3]. Fiecare membru al grupului a fost testat în duplicat, în 2 cicluri pe zi, timp de 20 de zile, de către un operator, utilizând:

- 1 lot AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5
- 1 lot AltoStar® Purification Kit 1.5
- 1 lot AltoStar® Internal Control 1.5
- 1 instrument AltoStar® AM16
- 1 instrument CFX96™ DW Dx

În tabelul 20, estimările repetabilității și preciziei în cadrul laboratorului sunt prezentate atât ca deviație standard (SD), cât și ca coeficient de variație (CV %) obținute pentru proba pozitivă cu valori înalte de HAdV, proba pozitivă cu valori scăzute de HAdV și pentru IC (pe baza valorilor C_q) în proba negativă pentru HAdV. Datele privind precizia prezentate au fost obținute prin analizarea manuală a datelor cu software-ul CFX Manager™ Dx, precum și prin utilizarea interpretării automate a rezultatelor cu FastFinder Standalone și cu pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5.

Tabelul 20: Repetabilitatea și precizia în cadrul laboratorului pentru setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5

		Repetabilitate		Precizie în cadrul laboratorului	
Software-ul CFX Manager™ Dx					
Probă	Cuantificare medie (log10 copii/ml)	SD (log10 copii/ml)	CV %	SD (log10 copii/ml)	CV %
Pozitivă cu valori înalte	3,90	0,06	1,53	0,11	2,73
Pozitivă cu valori scăzute	3,06	0,12	3,79	0,16	5,09
	Medie (valori C_q)	SD (valori C_q)	CV %	SD (valori C_q)	CV %
Negativă	26,12	0,05	0,18	0,20	0,76
Pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5					
Probă	Cuantificare medie (log10 copii/ml)	SD (log10 copii/ml)	CV %	SD (log10 copii/ml)	CV %
Pozitivă cu valori înalte	3,93	0,06	1,58	0,11	2,74
Pozitivă cu valori scăzute	3,08	0,12	3,77	0,15	4,99
	Medie (valori C_q)	SD (valori C_q)	CV %	SD (valori C_q)	CV %
Negativă	23,97	0,23	0,94	0,41	1,71

Toate probele negative au fost confirmate ca negative utilizând software-ul CFX Manager™ Dx și pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5.

Pentru evaluarea reproductibilității, fiecare element al panelului a fost testat în 6 replici, în 3 cicluri, de către 3 operatori, utilizând:

- 3 loturi AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5
- 3 loturi AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 loturi AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 instrumente AltoStar® AM16
- 3 instrumente CFX96™ DW Dx

În tabelul 21, estimările reproductibilității sunt prezentate atât ca deviație standard (SD), cât și ca coeficient de variație (CV %) obținute pentru proba pozitivă cu valori înalte de HAdV, proba pozitivă cu valori scăzute de HAdV și pentru IC (pe baza valorilor C_q) în proba negativă de HAdV. Datele privind precizia prezentate au fost obținute prin analizarea manuală a datelor cu software-ul CFX Manager™ Dx, precum și prin utilizarea interpretării automate a rezultatelor cu FastFinder Standalone și cu pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5.

Tabelul 21: Reproductibilitatea setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5

		Reproductibilitate	
Software-ul CFX Manager™ Dx			
Probă	Cuantificare medie (log10 copii/ml)	SD (log10 copii/ml)	CV %
Pozitivă cu valori înalte	3,90	0,07	1,71
Pozitivă cu valori scăzute	3,13	0,14	4,33
	Medie (valori C_q)	SD (valori C_q)	CV %
Negativă	26,75	0,40	1,49

		Reproductibilitate	
Pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5			
Probă	Cuantificare medie (log10 copii/ml)	SD (log10 copii/ml)	CV %
Pozitivă cu valori înalte	3,90	0,06	1,61
Pozitivă cu valori scăzute	3,13	0,13	4,22
	Medie (valori C_q)	SD (valori C_q)	CV %
Negativă	23,93	0,26	1,09

Toate probele negative au fost confirmate ca negative utilizând software-ul CFX Manager™ Dx și pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5.

9.1.6 Rată totală de eșec

Robustețea setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 a fost evaluată prin testarea a 30 de probe de plasmă negative pentru HAdV provenite de la donatori individuali, îmbogățite cu HAdV până la o concentrație finală de 3 x LD (4,23E+02 copii/ml). Toate (30 din 30) probele au fost testate cu rezultat pozitiv în canalul de detecție a fluorescenței specific pentru HAdV (FAM™).

9.1.7 Transfer

Transferul este în mare parte un risc dependent de fluxul de lucru și independent de testul PCR utilizat. Pentru AltoStar® Workflow (flux de lucru) s-a utilizat ca model exemplar setul AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5. Contaminarea încrucișată potențială prin transferul de la probe pozitive cu valori înalte a fost evaluată prin testarea alternativă a probelor pozitive cu valori înalte pentru parvovirusul B19 (1,00E+07 UI/ml) și a probelor negative (n = 44 fiecare per ciclu; 5 de cicluri) cu setul AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5. Nu s-a observat niciun caz de transfer, adică toate probele negative pentru parvovirusul B19 au avut rezultate negative.

9.1.8 Performanță clinică

Setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 a fost evaluat într-un studiu comparativ cu setul RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 (altona Diagnostics) cu marcaj CE. Au fost testate retrospectiv, în paralel, 31 de probe de plasmă:

Setul RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 (altona Diagnostics) a fost utilizat în combinație cu setul MagNA Pure® LC Total NA Isolation Kit (Roche), pe instrumentele MagNA Pure® 96 Instrument (Roche) și m2000rt Instrument (Abbott Molecular).

Setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 a fost utilizat în combinație cu setul AltoStar® Purification Kit 1.5 și AltoStar® Internal Control 1.5 pe sistemul de automatizare AltoStar® AM16 și CFX96™ DW Dx.

Pentru analiza calitativă, au fost excluse toate probele cu un rezultat invalid pentru unul sau ambele teste, precum și probele cu un rezultat cantitativ sub LD pentru unul sau ambele teste.

Rezultatele pentru cele 30 de probe rămase sunt prezentate în tabelul 22.

Tabelul 22: Rezultatele evaluării sensibilității și specificității diagnostice pentru HAdV în probele de plasmă

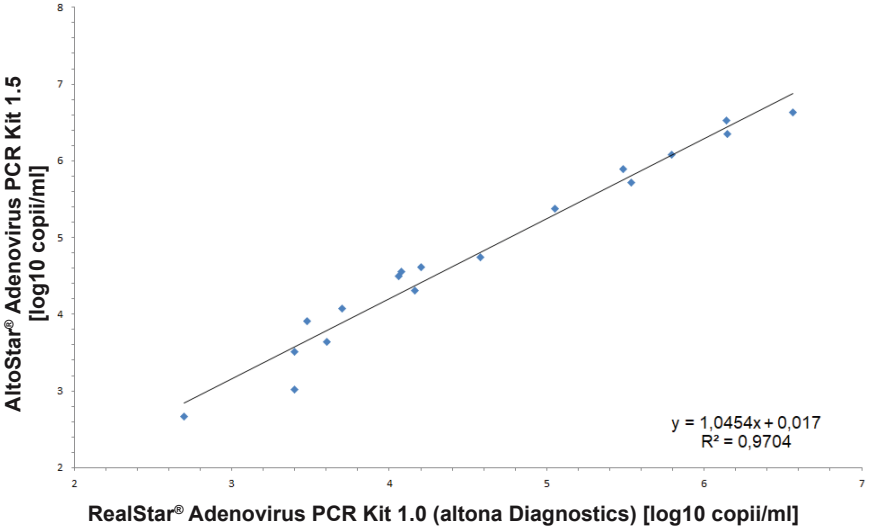
		RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 (altona Diagnostics)	
		POZITIV	NEGATIVĂ
AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5	POZITIV	20	0
	NEGATIVĂ	0	10

Sensibilitatea și specificitatea diagnostice ale setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5, comparativ cu setul RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 (altona Diagnostics), au fost de 100 %.

Pentru corelația cantitativă, probele cu rezultat negativ la unul sau ambele teste și probele cu un rezultat cantitativ sub LIC la unul sau ambele teste au fost excluse.

Rezultatele celor 18 de probe rămase au fost utilizate pentru corelația cantitativă prin analiza de regresie liniară (consultați ilustrația 17).

RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 (altona Diagnostics) comparativ cu setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5



Ilustr. 17: Analiza de regresie liniară a rezultatelor obținute cu setul RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 (altona Diagnostics) (referință) și setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5

A existat o corelație foarte bună între rezultatele cantitative obținute cu setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 și setul RealStar® Adenovirus PCR Kit 1.0 (altona Diagnostics) [coeficient de corelație R = 0,99 (R^2 = 0,97)].

9.2 Sânge integral

9.2.1 Sensibilitate analitică

Pentru determinarea limitei de detecție (LD), a fost generată o serie de diluții în sânge integral a materialului HAdV disponibil pe piață, cuprinsă între 3,16E+03 și 1,00E+01 copii/ml.

Fiecare diluție a fost testată în 8 replici în 3 cicluri diferite (total n = 24 per diluție) utilizând combinații de:

- 3 loturi AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5
- 3 loturi AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 loturi AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 instrumente AltoStar® AM16
- 3 instrumente CFX96™ DW Dx

Datele din toate ciclurile au fost combinate și s-a efectuat o analiză probit pentru a determina valoarea LD de 95 %.

Tabelul 23: Rezultatele PCR utilizate pentru calcularea sensibilității analitice a setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5

Concentrație [copii/ml]	N [total]	N [pozitive]	Rată de succesiune [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
7,50E+02	24	24	100
5,00E+02	24	24	100
3,16E+02	24	22	92
1,50E+02	24	17	71
5,00E+01	24	8	33
2,00E+01	24	4	17
1,00E+01	24	1	4

LD a setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 pentru detectarea HAdV în sânge integral este de 382 copii/ml (interval de încredere 95 %: 262-652 copii/ml).

9.2.2 Specificitate analitică

Specificitatea analitică a setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 este asigurată prin selecția riguroasă a oligonucleotidelor (primeri și sonde). Oligonucleotidele au fost verificate prin analiza comparativă a secvențelor cu secvențele disponibile public, pentru a garanta că toate genotipurile HAdV relevante vor fi detectate.

Pentru verificarea specificității analitice a setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 au fost efectuate următoarele experimente (consultați capitolele 9.2.2.1 Probe negative până la 9.2.2.3 Reactivitate încrucișată).

9.2.2.1 Probe negative

Au fost testate 30 de probe de sânge integral negative pentru HAdV, provenite de la donatori individuali, utilizând setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5. Toate probele (30 din 30) au fost testate cu rezultat negativ pentru ADN-ul specific HAdV și pozitiv pentru IC. Specificitatea analitică a setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 pentru probele de sânge integral este ≥ 95 %.

9.2.2.2 Substanțe interferente

Pentru a evalua influența substanțelor endogene și exogene cu potențial de interferență asupra performanței setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5, substanțele selectate au fost adăugate în probe de sânge integral. Aceste probe de sânge integral conțineau HAdV într-o concentrație de 3 x LD (1,15E+03 copii/ml), 1,00E+04 copii/ml și, respectiv, zero HAdV.

Rezultatele obținute pentru probele care conțineau substanțe potențial interferente au fost comparate cu rezultatele generate pentru probele de sânge integral care nu conțineau substanțe interferente adăugate. Fiecare probă a fost prelucrată în 3 replici.

Nu s-au observat interferențe pentru probele care conțineau niveluri ridicate de:

- Substanțe endogene
  - Bilirubină
  - Hemoglobină
  - ADN genomic uman
  - Albumină serică umană
  - Trigliceride
- Substanțe exogene
  - Azatioprină
  - Ciclosporină
  - Foscarnet
  - Ganciclovir

ATENȚIE

Prezența inhibitorilor PCR (de exemplu, heparina) ar putea determina rezultate fals negative sau invalide.

9.2.2.3 Reactivitate încrucișată

Consultați capitolul 9.1.2.3 Reactivitate încrucișată.

ATENȚIE

În cazul în care proba conține alți agenți patogeni în afară de HAdV, poate apărea o competiție cu amplificarea targetului sau reacții încrucișate, ceea ce poate duce la rezultate incorecte ale examinării IVD.

9.2.3 Reactivitate

Consultați capitolul 9.1.3 Reactivitate.

ATENȚIE

Mutațiile potențiale din regiunile target ale genomului de HAdV acoperite de primerii și/sau sondele utilizate în set pot duce la subcuantificare și/sau la eșecul detectării prezenței agentului patogen.

9.2.4 Interval liniar

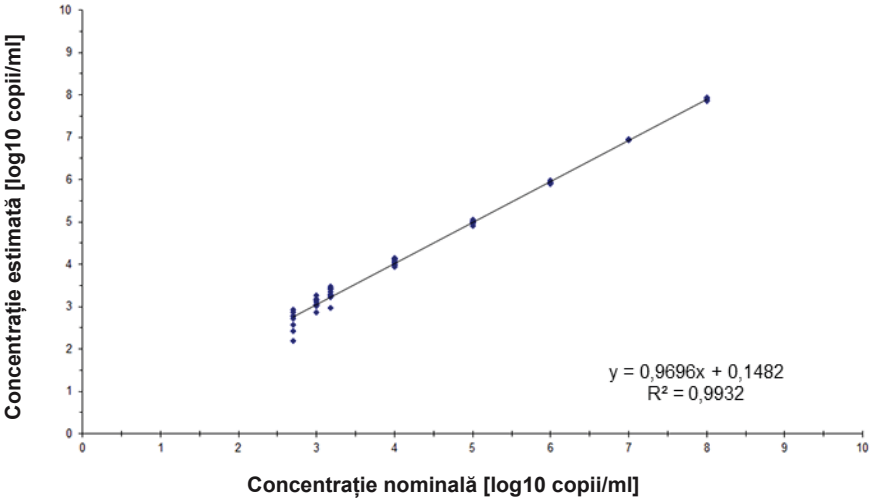
Pentru determinarea intervalului liniar al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 a fost testată o serie de diluții de HAdV în sânge integral cuprinsă între 1,00E+08 și 2,00E+02 copii/ml:

- Diluțiile cu o concentrație cuprinsă între 1,00E+08 și 1,00E+06 copii/ml au fost testate în 4 replici.
- Diluțiile cu o concentrație cuprinsă între 1,00E+05 și 2,00E+02 copii/ml au fost testate în 8 replici.

Analiza a fost efectuată pe baza unei regresii polinomiale.

Intervalul liniar al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 pentru cuantificarea HAdV în sânge integral este 5,00E+02-1,00E+08 copii/ml. Reprezentarea grafică a datelor este prezentată în ilustrația 18.

Concentrația estimată log10 comparativ cu concentrația nominală log10 a setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5



Ilustr. 18: Analiza de regresie liniară a setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 cu probe de sânge integral

9.2.5 Precizie

Precizia setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 a fost evaluată utilizând un grup format din:

- 1 probă de sânge integral pozitivă cu valori înalte de HAdV (1,00E+04 UI/ml echivalent cu 8,00E+03 copii/ml)
- 1 probă de sânge integral pozitivă cu valori scăzute de HAdV (1,50E+03 UI/ml echivalent cu 1,20E+03 copii/ml)
- 1 probă de sânge integral negativă pentru HAdV

Datele au fost determinate pe baza:

- Valorilor de cuantificare pentru proba pozitivă cu valori scăzute de HAdV
- Valorilor ciclului de prag (C_q*) pentru IC din proba negativă de HAdV

* Vă rugăm să rețineți că termenul ales C_q este echivalent cu denumirea C_t, care poate fi utilizată de alte ciclatoare decât CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad).

Datele privind repetabilitatea au fost generate în conformitate cu recomandările din ghidul CLSI EP05-A3 [„Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition" (Evaluarea preciziei procedurilor de măsurare cantitativă; Ghid aprobat — Ediția a treia)] [3]. Fiecare membru al grupului a fost testat în duplicat, în 2 cicluri pe zi, timp de 20 de zile, de către un operator, utilizând:

- 1 lot AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5
- 1 lot AltoStar® Purification Kit 1.5
- 1 lot AltoStar® Internal Control 1.5
- 1 instrument AltoStar® AM16
- 1 instrument CFX96™ DW Dx

În tabelul 24, estimările repetabilității și preciziei în cadrul laboratorului sunt prezentate atât ca deviație standard (SD), cât și ca coeficient de variație (CV %) obținute pentru proba pozitivă cu valori înalte de HAdV, proba pozitivă cu valori scăzute de HAdV și pentru IC (pe baza valorilor C_q) în proba negativă pentru HAdV. Datele privind precizia prezentate au fost obținute prin analizarea manuală a datelor cu software-ul CFX Manager™ Dx, precum și prin utilizarea interpretării automate a rezultatelor cu FastFinder Standalone și cu pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5.

Tabelul 24: Repetabilitatea și precizia în cadrul laboratorului pentru setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5

		Repetabilitate		Precizie în cadrul laboratorului	
Software-ul CFX Manager™ Dx					
Probă	Cuantificare medie (log10 copii/ml)	SD (log10 copii/ml)	CV %	SD (log10 copii/ml)	CV %
Pozitivă cu valori înalte	4,12	0,11	2,73	0,14	3,36
Pozitivă cu valori scăzute	3,24	0,13	4,16	0,21	6,33
	Medie (valori C_q)	SD (valori C_q)	CV %	SD (valori C_q)	CV %
Negativă	27,14	0,11	0,39	0,22	0,80
Pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5					
Probă	Cuantificare medie (log10 copii/ml)	SD (log10 copii/ml)	CV %	SD (log10 copii/ml)	CV %
Pozitivă cu valori înalte	4,13	0,11	2,66	0,14	3,29
Pozitivă cu valori scăzute	3,26	0,13	3,94	0,20	6,08
	Medie (valori C_q)	SD (valori C_q)	CV %	SD (valori C_q)	CV %
Negativă	24,06	0,20	0,83	0,32	1,32

Toate probele negative au fost confirmate ca negative utilizând software-ul CFX Manager™ Dx și pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5.

Pentru evaluarea reproductibilității, fiecare element al panelului a fost testat în 6 replici, în 3 cicluri, de către 3 operatori, utilizând:

- 3 loturi AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5
- 3 loturi AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 loturi AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 instrumente AltoStar® AM16
- 3 instrumente CFX96™ DW Dx

În tabelul 25, estimările reproductibilității sunt prezentate atât ca deviație standard (SD), cât și ca coeficient de variație (CV %) obținute pentru proba pozitivă cu valori înalte de HAdV, proba pozitivă cu valori scăzute de HAdV și pentru IC (pe baza valorilor C_q) în proba negativă de HAdV. Datele privind precizia prezentate au fost obținute prin analizarea manuală a datelor cu software-ul CFX Manager™ Dx, precum și prin utilizarea interpretării automate a rezultatelor cu FastFinder Standalone și cu pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5.

Tabelul 25: Reproductibilitatea setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5

		Reproductibilitate	
Software-ul CFX Manager™ Dx			
Probă	Cuantificare medie (log10 copii/ml)	SD (log10 copii/ml)	CV %
Pozitivă cu valori înalte	4,20	0,16	3,83
Pozitivă cu valori scăzute	3,32	0,14	4,13
	Medie (valori C_q)	SD (valori C_q)	CV %
Negativă	27,08	0,64	2,34

		Reproductibilitate	
Pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5			
Probă	Cuantificare medie (log10 copii/ml)	SD (log10 copii/ml)	CV %
Pozitivă cu valori înalte	4,21	0,15	3,56
Pozitivă cu valori scăzute	3,34	0,14	4,22
	Medie (valori C_q)	SD (valori C_q)	CV %
Negativă	24,11	0,47	1,95

Toate probele negative au fost confirmate ca negative utilizând software-ul CFX Manager™ Dx și pluginul de testare al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5.

9.2.6 Rată totală de eșec

Robustețea setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 a fost evaluată prin testarea a 30 de probe de sânge integral negative pentru HAdV provenite de la donatori individuali, îmbogățite cu HAdV până la o concentrație finală de 3 x LD (1,15E+03 copii/ml). Toate (30 din 30) probele au fost testate cu rezultat pozitiv în canalul de detecție a fluorescenței specific pentru HAdV (FAM™).

9.2.7 Transfer

Consultați capitolul 9.1.7 Transfer.

9.2.8 Performanță clinică

Setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 a fost evaluat într-un studiu comparativ cu setul Adenovirus R-gene® kit (bioMérieux) cu marcaj CE. Au fost testate retrospectiv, în paralel, 79 de probe de sânge integral:

Setul Adenovirus R-gene® kit (bioMérieux) a fost utilizat pe sistemul NucliSENS® easyMAG® System (bioMérieux) și pe modulul AD al sistemului VERSANT® kPCR Molecular System (Siemens).

Setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 a fost utilizat în combinație cu setul AltoStar® Purification Kit 1.5 și AltoStar® Internal Control 1.5 pe sistemul de automatizare AltoStar® AM16 și CFX96™ DW Dx.

Pentru analiza calitativă, au fost excluse toate probele cu un rezultat invalid pentru unul sau ambele teste, precum și probele cu un rezultat cantitativ sub LD pentru unul sau ambele teste.

Rezultatele pentru cele 73 de probe rămase sunt prezentate în tabelul 26.

Tabelul 26: Rezultatele evaluării sensibilității și specificității de diagnostic pentru HAdV în probe de sânge integral

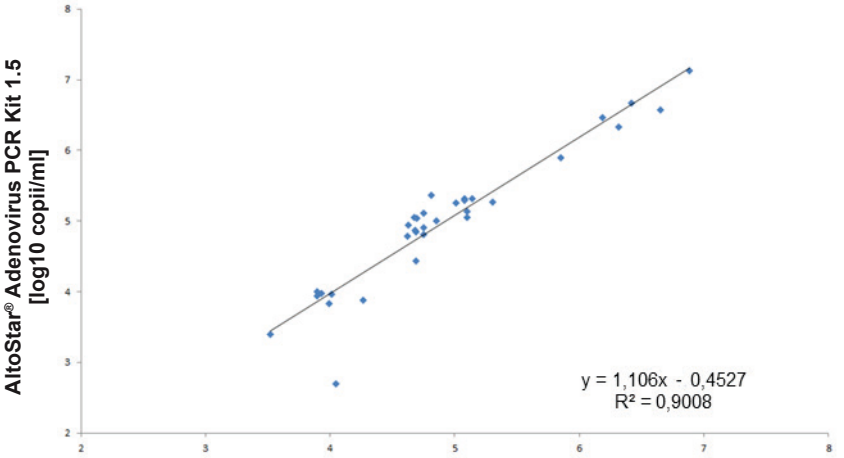
		Adenovirus R-gene® kit (bioMérieux)	
		POZITIV	NEGATIVĂ
AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5	POZITIV	50	0
	NEGATIVĂ	0	23

Sensibilitatea și specificitatea diagnostice ale setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5, comparativ cu setul Adenovirus R-gene® kit (bioMérieux), au fost de 100 %.

Pentru corelația cantitativă, probele cu rezultat negativ la unul sau ambele teste și probele cu un rezultat cantitativ sub LIC la unul sau ambele teste au fost excluse.

Rezultatele celor 33 de probe rămase au fost utilizate pentru corelația cantitativă prin analiza de regresie liniară (consultați ilustrația 19).

Adenovirus R-gene® kit (bioMérieux) comparativ cu setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5



Ilustr. 19: Analiza de regresie liniară a rezultatelor obținute cu setul Adenovirus R-gene® kit (bioMérieux) (referință) și cu setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5

A existat o corelație foarte bună între rezultatele cantitative obținute cu setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 și setul Adenovirus R-gene® kit (bioMérieux) [coeficient de corelație R = 0,95 (R^2 = 0,90)].

10. Depozitare

Depozitați deșeurile periculoase și biologice în conformitate cu reglementările locale și naționale. Componentele rămase ale produsului și deșeurile nu trebuie lăsate să ajungă în canalizare, cursuri de apă sau în sol.

ATENȚIE

Tratați întotdeauna probele ca material infecțios și periculos (biologic), conform procedurilor de siguranță și de laborator. Pentru vărsările de material de probă, utilizați imediat un dezinfectant adecvat. Manevrați materialele contaminate ca fiind periculoase biologic.

ATENȚIE

Eliminarea deșeurilor periculoase și biologice trebuie să fie conformă cu reglementările locale și naționale, pentru a evita contaminarea mediului.

NOTĂ

Placa PCR trebuie eliminată în stare sigilată, deoarece folia de sigilare a plăcii PCR nu poate fi îndepărtată.

11. Controlul calității

În conformitate cu sistemul de management al calității al altona Diagnostics GmbH certificat EN ISO 13485, fiecare lot al setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 este testat conform specificațiilor predefinite pentru a asigura o calitate constantă a produsului.

12. Asistență tehnică

Pentru ajutor pentru clienți, contactați asistența tehnică altona Diagnostics:

e-mail:	**support@altona-diagnostics.com**
telefon:	**+49-(0)40-5480676-0**

NOTĂ

Orice incident grav care a avut loc în legătură cu acest produs trebuie raportat către altona Diagnostics și autoritatea competentă din țara dvs.

13. Rezumat privind siguranța și performanța

Rezumatul privind siguranța și performanța întocmit pentru AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 poate fi găsit în Baza de date europeană privind dispozitivele medicale (EUDAMED): https://ec.europa.eu/tools/eudamed

14. Literatura de specialitate

[1] Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

[2] Cohen, Jonathan; Powderly, William G.; Opal, Steven M. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

[3] CLSI. *Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition.* CLSI document EP05-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

15. Mărcile comerciale și declinările de răspundere

4s3™ (4titude); AltoStar®, RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism®, QuantStudio™ (Applied Biosystems); NucliSENS®, R-gene® (bioMérieux); CFX96™, CFX Manager™ (Bio-Rad); Rotor-Gene® (QIAGEN); LOINC® (Regenstrief Institute, Inc.); LightCycler®, MagNA Pure® (Roche); VERSANT® (Siemens); FAM™, JOE™, MicroAmp™, VIC™ (Thermo Fisher Scientific).

Numele, mărcile comerciale etc. înregistrate utilizate în acest document, chiar dacă nu sunt marcate în mod specific ca atare, nu trebuie considerate neprotejate de lege.

Setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 este un produs cu marcaj CE conform Regulamentului (UE) 2017/746 privind dispozitivele medicale pentru diagnostic *in vitro*.

Produsul nu este aprobat sau autorizat de FDA.

Nu este disponibil în toate țările.

© 2026 altona Diagnostics GmbH; toate drepturile rezervate.

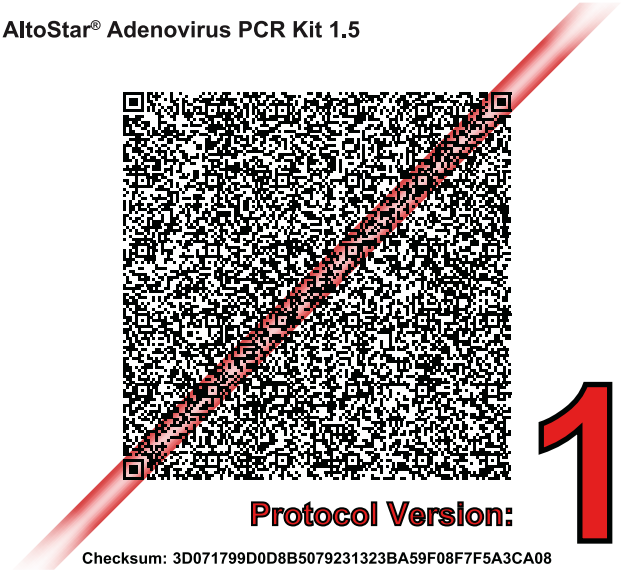
16. Simboluri

Simbol	Explicație
IVD	Dispozitiv medical pentru diagnostic *in vitro*
GTIN	Numărul articolului comercial global
LOT	Codul lotului
CONT	Conținut
CAP	Culoare capac
REF	Număr de catalog
NUM	Număr
COMP	Componentă
MAT	Numărul materialului
VN	Numărul versiunii
	Versiune
	Consultați instrucțiunile de utilizare

Simbol	Explicație
	Conținut suficient pentru „n” teste/reacții (rxns)
	Limită de temperatură
	Data expirării
	Producător
	Data fabricației
	Atenție
	Notă
	Conține material biologic de origine animală

17. Protocol de testare pentru AltoStar® Connect software și informații pentru integrarea în LIMS

Codul de bare 2D din ilustrația 20 trebuie utilizat pentru instalarea celui mai recent protocol de testare pentru utilizarea setului AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5 cu sistemul de automatizare AltoStar® AM16. Codul de bare poate fi scanat numai în formă tipărită. Puteți scana codul de bare direct din manual sau îl puteți imprima pe o foaie separată. Vă rugăm să rețineți că dimensiunea tipăririi afectează capacitatea de scanare a codului de bare. Asigurați-vă că scalați dimensiunea la 100 %. Pentru scanare, îndreptați scanerul către linia roșie de pe codul de bare. Pentru detalii privind gestionarea protocoalelor de testare, consultați capitolul corespunzător din instrucțiunile de utilizare ale software-ului AltoStar® Connect Software. Pentru informații privind integrarea în LIMS, consultați tabelul 28.



Ilustr. 20: Codul de bare al protocolului de testare pentru setul AltoStar® Adenovirus PCR Kit 1.5

Tabelul 27: Istoricul modificărilor pentru protocolul de testare

Versiunea protocolului	Actualizări ale versiunilor
1	Versiunea inițială

Tabelul 28: Informații pentru integrarea în LIMS

Utilizare	Date
Ordinea de testare (LIMS → sistem de automatizare AltoStar® AM16)	AltoStar Adenovirus PCR Kit 1.5
Unitatea pentru rezultatul testului (CFX96™ DW Dx → LIMS)	cp/ml
Canalul 1 pentru rezultatul testului (CFX96™ DW Dx → LIMS)	Adenovirus
Canalul 2 pentru rezultatul testului (CFX96™ DW Dx → LIMS)	Internal Control

Pentru LOINC® (Logical Observation Identifiers Names and Codes) vă rugăm să consultați site-ul altona Diagnostics GmbH (www.altona-diagnostics.com) sau să contactați asistența tehnică altona Diagnostics (consultați capitolul 12. Asistență tehnică).

18. Istoricul revizuirilor

Tabelul 29: Istoricul revizuirilor

Identificator	Data emiterii [lună/an]	Modificări
MAN-AS0301540-RO-S01	12/2025	Versiunea inițială

pagina a fost lăsată în mod intenționat necompletată

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