



Manual do kit *artus*[®] CMV TM PCR

 24 (n.º de catálogo 4503163)

 96 (n.º de catálogo 4503165)

Diagnóstico in vitro quantitativo

Para utilização com os *ABI PRISM*[®] 7000, 7700 e 7900HT Sequence Detection Systems

Dezembro de 2014 — Versão 1



4503163, 4503165



1046905PT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R3

MAT

1046905PT



QIAGEN Sample and Assay Technologies

A QIAGEN é o principal fornecedor de tecnologias inovadoras de amostragem e ensaio, permitindo o isolamento e a detecção do conteúdo de qualquer amostra biológica. Os produtos e serviços avançados e de elevada qualidade da nossa empresa são garantia de sucesso, desde a amostra ao resultado.

A QIAGEN é uma empresa de referência em matéria de:

- Purificação de ADN, ARN e proteínas
- Ensaio de ácidos nucleicos e proteínas
- Investigação em microARN e ARNi
- Automatização de tecnologias de amostragem e ensaio

A nossa missão é permitir ao utilizador alcançar um grande sucesso, bem como resultados notáveis. Para mais informações, visite www.qiagen.com.

Índice

1. Conteúdo	4
2. Armazenamento	4
3. Materiais e dispositivos adicionais necessários	4
4. Medidas gerais de segurança	5
5. Informações acerca do agente patogénico	5
6. Princípio da PCR em tempo real	5
7. Descrição do produto	5
8. Protocolo	5
8.1 Pré-analítica: Colheita, conservação e transporte de amostras ...	5
8.1.1 Colheita de amostras	6
8.1.2 Conservação	6
8.1.3 Transporte de amostras	6
8.1.4 Substâncias interferentes	6
8.2 Isolamento de ADN	6
8.3 Controlo interno	7
8.4 Quantificação	7
8.5 Preparação da PCR	8
8.6 Programação do <i>ABI PRISM SDS</i>	12
8.6.1 Programação do <i>ABI PRISM 7000 SDS</i>	12
8.6.2 Programação do <i>ABI PRISM 7700 SDS</i>	14
8.6.3 Programação do <i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>	18
9. Análise de dados	21
10. Resolução de problemas	24
11. Especificações	25
11.1 Sensibilidade analítica	25
11.2 Especificidade	26
11.3 Precisão	27
11.4 Robustez	28
11.5 Reprodutibilidade	28
11.6 Avaliação diagnóstica	28
12. Limitações da utilização do produto	29
13. Informações de segurança	29
14. Controlo de qualidade	29
15. Referências	29
16. Explicação dos símbolos	30

Kit *artus* CMV TM PCR

Para utilização com os *ABI PRISM 7000*, *7700* e *7900HT Sequence Detection Systems* para a detecção quantitativa de ADN do CMV em plasma com EDTA.

Atenção: O kit *artus* CMV TM PCR não pode ser utilizado em conjunto com o *GeneAmp® 5700 SDS* nem com as placas de formato 384 do *ABI PRISM 7900HT SDS*.

1. Conteúdo

	Rotulagem e conteúdo	N.º art. 4503163 24 reações	N.º art. 4503165 96 reações
Azul	<i>CMV TM Master</i>	2 x 12 reações	8 x 12 reações
Amarelo	<i>CMV LC/RG/TM Mg-Sol[¶]</i>	1 x 600 µl	1 x 600 µl
Vermelho	<i>CMV LC/RG/TM QS 1^ª</i> <i>1 x 10⁴ cópias/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Vermelho	<i>CMV LC/RG/TM QS 2^ª</i> <i>1 x 10³ cópias/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Vermelho	<i>CMV LC/RG/TM QS 3^ª</i> <i>1 x 10² cópias/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Vermelho	<i>CMV LC/RG/TM QS 4^ª</i> <i>1 x 10¹ cópias/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Verde	<i>CMV TM IC[¶]</i>	1 x 1000 µl	2 x 1000 µl
Branco	<i>Água (grau PCR)</i>	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl

- ¶ QS = Padrão de quantificação
IC = Controlo interno
Mg-Sol = Solução de magnésio

2. Armazenamento

Os componentes do kit *artus* CMV TM PCR devem ser conservados entre -15 °C e -30 °C e são estáveis até ao prazo de validade impresso no rótulo. A repetida descongelação e congelação (> 2 x) deve ser evitada uma vez que pode reduzir a sensibilidade. Se os reagentes se destinarem a ser usados de forma intermitente, devem ser congelados em alíquotas. Se houver a necessidade de conservar os componentes a +4 °C, não se deve ultrapassar um período de cinco horas.

3. Materiais e dispositivos adicionais necessários

- Luvas de laboratório isentas de pó
- Kit de isolamento de ADN (ver **8.2 Isolamento de ADN**)
- Pipetas (ajustáveis)
- Pontas de pipetas estéreis com filtros
- Misturador vórtex
- Centrífuga de mesa com rotor para tubos de reação de 2 ml
- Centrífuga com rotor para microplacas (opcional)
- Tubos/placas de reação de 96 poços para medições óticas com os respetivos materiais de selagem óticos* (ver **8.5 Preparação da PCR**)
- Armação de suporte de 96 poços de duas peças para utilização com tubos de reação ótica (96-Well Tray/Retainer Set, n. de cat. 403 081, Applied Biosystems), ver **8.5 Preparação da PCR**
- Almofada de compressão para utilização com folhas selantes óticas (*Optical Cover Compression Pads*, n. de cat. 4 312 639, Applied Biosystems), ver **8.5 Preparação da PCR**
- Aplicador para selagem das placas de reação através da utilização de folhas selantes óticas (*Adhesive Seal Applicator Kit*, n. de cat. 4 333 183, Applied Biosystems)

* A utilização de tubos de reação para análises óticas com tampas convexas só é permitida para o instrumento *BI PRISM 7700 SDS* e requer um ajuste do tempo de exposição (ver **8.6.2 Programação do ABI PRISM 7700 SDS**, 8.6.2.5 Definições adicionais importantes).

- *ABI PRISM 7000* (versão de software 1.0.1), *7700* (versão de software 1.9.1) ou *7900HT SDS* (versão de software 2.1)

Atenção: Antes de colocar o aparelho em funcionamento, é necessário realizar uma calibração válida dos corantes (*Pure Spectra Component File*) e do fundo (*Background Component File*).

4. Medidas gerais de segurança

O utilizador deve ter sempre em atenção o seguinte:

- Utilizar pontas de pipetas estéreis com filtros.
- Armazenar e extrair materiais positivos (amostras, controlos e fragmentos amplificados) separadamente dos restantes reagentes e adicioná-los à mistura de reação numa unidade situada num espaço separado.
- Descongelar completamente todos os componentes à temperatura ambiente antes de dar início a um ensaio.
- De seguida, misturar completamente e centrifugar brevemente os componentes.
- Trabalhar rapidamente em gelo ou num bloco de refrigeração.

5. Informações acerca do agente patogénico

O citomegalovírus humano (CMV) é encontrado no sangue, tecidos e praticamente todos os fluidos corporais de pessoas infetadas. A transmissão pode ocorrer por via oral, sexual, por transfusão sanguínea ou transplantação de órgãos, por via intrauterina ou perinatal. A infeção por CMV é frequentemente uma infeção assintomática, a que se segue um período de latência permanente do vírus no corpo. Caso a infeção seja sintomática, em adolescentes ou em adultos, os sintomas são semelhantes aos da mononucleose infecciosa e incluem febre, hepatite ligeira e indisposição geral. Foram observados vários episódios de infeção por CMV, em particular nos doentes infetados por via intrauterina ou em doentes imunodeficientes.

6. Princípio da PCR em tempo real

O diagnóstico de agentes patogénicos pela reação em cadeia da polimerase (PCR) baseia-se na amplificação de regiões específicas do genoma do agente patogénico. Através da PCR em tempo real, o produto amplificado é detetado com recurso a corantes fluorescentes. Estes estão habitualmente aglutinados a sondas de oligonucleotídeos que se ligam especificamente ao produto amplificado. A monitorização das intensidades de fluorescência durante o ensaio de PCR (ou seja, em tempo real) permite a deteção e quantificação do produto que se acumula sem ter de reabrir os tubos de reação após o ensaio de PCR (Mackay, 2004).

7. Descrição do produto

O kit *artus* CMV TM PCR é um sistema pronto a utilizar para a deteção de ADN do CMV através da reação em cadeia da polimerase (PCR) nos *ABI PRISM 7000*, *7700* e *7900HT Sequence Detection Systems*. O *CMV TM Master* contém os reagentes e enzimas para a amplificação específica de uma região de 105 pb do genoma do CMV. A deteção de fragmentos amplificados ocorre através da medição de fluorescência FAM™ no *ABI PRISM SDS*. Ao mesmo tempo, o kit *artus* CMV TM PCR contém um segundo sistema de amplificação heterólogo para identificar uma possível inibição da PCR. Este é detetado como um *controlo interno (IC)* através da medição de fluorescência VIC®/JOE™. O limite de deteção da PCR analítica do CMV (ver 11.1 **Sensibilidade analítica**) não é reduzido. São fornecidos controlos positivos externos (*CMV LC/RG/TM QS 1 – 4*) que permitem a determinação da carga de agente patogénico. Para mais informações, ver a secção 8.4 **Quantificação**.

Atenção: O perfil de temperatura para a deteção do citomegalovírus utilizando o kit *artus* CMV TM PCR corresponde aos perfis do kit *artus* EBV TM PCR e kit *artus* HSV-1/2 TM PCR. Por consequência, os ensaios de PCR destes sistemas *artus* podem ser realizados e analisados num único procedimento de ensaio. Ter em atenção as recomendações relativas à análise de PCR fornecidas nos capítulos 8.4 **Quantificação** e 9. . ados.

8. Protocolo

8.1 Pré-analítica: Colheita, conservação e transporte de amostras

Atenção: Todas as amostras devem ser manuseadas como potencialmente infecciosas.

Atenção: Os estudos atuais apontam o plasma tratado com EDTA ou citrato como os materiais de amostra mais adequados para detecção do CMV. Por isso, recomendamos a utilização destes materiais com o kit *artus* CMV TM PCR.

A validação do kit *artus* CMV TM PCR foi efetuada usando amostras de plasma humano tratado com EDTA. Não existem outras amostras validadas. Utilizar apenas os kits de isolamento de ADN recomendados (ver **8.2 Isolamento de ADN**) para a preparação das amostras.

O uso de determinados materiais obriga ao rigoroso cumprimento de instruções específicas relativas a colheita, transporte e conservação.

8.1.1 Colheita de amostras

Toda colheita de sangue leva a uma lesão dos vasos sanguíneos (artérias, veias, capilares). Devem apenas ser usados materiais inócuos e estéreis. Estão disponíveis materiais descartáveis para colheita de sangue. Para a punção de veias, não se devem utilizar agulhas muito finas. A colheita de sangue venoso deve ocorrer em locais adequados na região da dobra do cotovelo, do antebraço ou do dorso da mão. O sangue deve ser colhido em tubos de amostra padrão (tampa vermelha, Sarstedt ou tubos equivalentes de outros fabricantes). Devem ser colhidos de 5 a 10 ml de sangue anticoagulado com EDTA. Inverter os tubos diretamente após colheita da amostra (8 vezes, não agitar).

Atenção: Não devem ser usadas amostras de doentes tratados com heparina (ver **8.1.4 Substâncias interferentes**).

8.1.2 Conservação

O sangue total deve ser separado em componentes celulares e plasma num período de seis horas através de centrifugação durante 20 minutos a 800 – 1600 x g. O plasma isolado tem de ser transferido para tubos de polipropileno estéreis. A sensibilidade do ensaio pode ser comprometida através da repetida congelação ou de uma conservação mais longa da amostra.

8.1.3 Transporte de amostras

O material de amostra deve ser transportado num contentor de transporte à prova de estilhaço. O perigo potencial de infeção devido a fuga da amostra pode, assim, ser evitado. As amostras devem ser transportadas de acordo com os regulamentos locais e nacionais relativos ao transporte de materiais patogénicos.^{*}

As amostras devem ser enviadas no prazo de seis horas. A conservação no local da colheita não é recomendada. É possível enviar as amostras por correio, de acordo com os regulamentos para o transporte de material patogénico. Recomenda-se o transporte da amostra por serviços de correio expresso. As amostras de sangue devem ser enviadas refrigeradas (+2 °C a +8 °C), enquanto que o plasma separado deve ser enviado congelado (-20°C).

8.1.4 Substâncias interferentes

Valores elevados de bilirrubina ($\leq 4,5$ mg/dl) e de lípidos (≤ 1100 mg/dl), assim como amostras hemolíticas, não influenciam o sistema analítico do CMV. A heparina afeta a PCR. Amostras colhidas em tubos com heparina como anticoagulante não devem ser utilizadas. As amostras de doentes tratados com heparina também não devem ser usadas.

8.2 Isolamento de ADN

O kit de isolamento que se segue é recomendado para isolar ADN de CMV:

Material de amostra	Kit de isolamento de ácido nucleico	Número de catálogo	Fabricante	ARN transportador
Plasma tratado com EDTA	Kit QIAamp® DSP Virus (50)	60704	QIAGEN	incluído

^{*} International Air Transport Association (Associação Internacional de Transporte Aéreo). Dangerous Goods Regulations, 41st Edition, 2000.704.

- A adição de **ARN transportador** é de grande importância para a eficiência e, com isso, para o rendimento do ADN/ARN. Para aumentar a estabilidade do ARN transportador fornecido com o kit QIAamp DSP Virus, deverão ser seguidas as indicações sobre o manuseamento e conservação do ARN transportador (ver “Preparação de reagentes e tampões” no manual do *kit QIAamp DSP Virus*).
- O kit de isolamento inclui tampões de lavagem que contêm **etanol**. Assegurar sempre de que é efetuada, antes da eluição, uma centrifugação adicional (três minutos, 13 000 rpm) para a eliminação dos resíduos de etanol. Isto evita possíveis inibições da PCR.

Importante: O *controlo interno* do kit *artus CMV TM PCR* pode ser utilizado diretamente no procedimento de isolamento. Assegurar de que é incluída uma amostra negativa de plasma no procedimento de isolamento. O sinal correspondente do *controlo interno* funciona como base para a avaliação do isolamento (ver **8.3**).

8.3 Controlo interno

É fornecido um *controlo interno* (*CMV TM IC*). Isto permite ao utilizador **controlar o procedimento de isolamento de ADN e verificar a possível inibição da PCR** (ver a Fig. 1). Para este fim, adicionar o *controlo interno* numa relação de 0,1 µl por 1 µl do volume de eluição no isolamento. Por exemplo, ao utilizar o kit QIAamp DSP Virus, o ADN é eluído em 60 µl de tampão AE. Daí que, devem ser adicionados 6 µl de *controlo interno*. A quantidade de *controlo interno* acrescentada depende **apenas** do volume de eluição.

O *controlo interno* e o ARN transportador (ver **8.2 Isolamento de ADN**) só devem ser adicionados a

- uma mistura de tampão de lise e amostra ou
- diretamente ao tampão de lise.

O *controlo interno* não pode ser adicionado diretamente à amostra. Se adicionado ao tampão de lise, ter em atenção que a mistura do *controlo interno* com o tampão de lise/ARN transportador deverá ser utilizada logo após ser preparada (a conservação da mistura à temperatura ambiente ou no frigorífico pode, em poucas horas, desativar o *controlo interno* e diminuir a eficiência da extração). **Não** adicionar o *controlo interno* e o ARN transportador diretamente na amostra.

Para a purificação ser considerada eficaz, o valor Ct do *controlo interno* de uma amostra negativa de plasma processada por purificação (Kit QIAamp DSP Virus) no *ABI PRISM 7000*, *7700* e *7900HT SDS* tem de atingir $Ct = 27 \pm 3$ (limite: *ABI PRISM 7000*: 0,1, *ABI PRISM 7700* e *7900HT SDS*: 0,2). A dispersão indicada baseia-se na variação do instrumento e na purificação. Um desvio maior aponta para problemas na purificação. Neste caso, é necessário analisar e, eventualmente, revalidar a purificação. Em caso de dúvidas ou problemas, contactar a nossa assistência técnica.

O *controlo interno* pode ser utilizado, opcionalmente, **exclusivamente para o controlo de uma possível inibição da PCR** (ver a Fig. 2). Para isso, adicionar 2 µl de *controlo interno* e 5 µl de *CMV LC/RG/TM Mg-Sol* por reação diretamente a 25 µl de *CMV TM Master*. Para cada reação de PCR, utilizar 30 µl de Master Mix desta forma produzida* e adicionar, de seguida, 20 µl de amostra purificada. Em caso de preparação de um ensaio de PCR para várias amostras, aumentar o volume de *CMV TM Master*, *CMV LC/RG/TM Mg-Sol* e de *controlo interno* proporcionalmente ao número de amostras (ver **8.5 Preparação da PCR**).

8.4 Quantificação

Os *padrões de quantificação* fornecidos (*CMV LC/RG/TM QS 1 – 4*) são tratados como amostras previamente purificadas e utilizados no mesmo volume (20 µl). Para criar uma curva padrão num *ABI PRISM Sequence Detection System*, devem ser utilizados todos os quatro *padrões de quantificação* e definidos como padrões com especificação das concentrações correspondentes (ver **8.6 Programação do ABI PRISM SDS**). Não é possível importar curvas padrão de ensaios anteriores com o software dos *ABI PRISM 7000*, *7700* e *7900HT SDS*.

* O aumento de volume causado através da adição de *controlo interno* é desprezável na preparação do ensaio por PCR. A sensibilidade do sistema de deteção não é afetada.

Caso tenha sido integrado mais do que um sistema *artus* herpes no ensaio de PCR, analisar estes diferentes sistemas com os *padrões de quantificação* correspondentes separadamente.

Atenção: De modo a assegurar uma quantificação precisa, é veementemente recomendado complementar a Master Mix utilizada para os *padrões de quantificação* com a respetiva quantidade de *controlo interno*. Para isso, adicionar para cada padrão de quantificação (*CMV LC/RG/TM QS 1 – CMV LC/RG/TM QS 4*) 2 µl de *controlo interno* e 5 µl de *CMV LC/RG/TM Mg-Sol* diretamente a 25 µl de *CMV TM Master* (ver esquema reproduzido na Fig. 2). Este esquema de pipetagem é normalmente aplicável aos *padrões de quantificação* do CMV, sendo independente do número de *padrões de quantificação* utilizados.

Os *padrões de quantificação* são definidos como cópias/µl. Para a conversão dos valores apurados com base na curva padrão em cópias/ml de amostra, deve-se utilizar a seguinte equação:

$$\text{Resultado (cópias/ml)} = \frac{\text{Resultado (cópias/}\mu\text{l)} \times \text{Volume de eluição (}\mu\text{l)}}{\text{Volume de amostra (ml)}}$$

Ter em atenção que, como regra geral, o volume de amostra inicial deve ser introduzido na equação acima representada. Isto tem de ser considerado quando o volume da amostra tiver sido alterado antes da extração do ácido nucleico (por ex.: reduzir o volume por centrifugação ou aumentar o volume adicionando ao volume necessário para o isolamento).

Importante: As diretrizes para a análise quantitativa dos sistemas *artus* no *ABI PRISM 7000 SDS* são fornecidas em www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX (**Technical Note for quantitation on the *ABI PRISM 7000 SDS* - Nota Técnica para quantificação nos *ABI PRISM 7000 SDS***).

8.5 Preparação da PCR

Preparar a quantidade necessária de tubos de reação ou uma placa de reação de 96 poços para as reações planeadas. Na tabela seguinte, encontram-se listados os materiais aconselhados:

Artigo	Descrição	Número de catálogo	Fabricante	Armação de suporte*	Almofada de compressão
Placa de reação ótica de 96 poços	Placa de reação ótica de 96 poços	4 306 737	Applied Biosystems	não	–
Folhas selantes óticas	Folhas selantes óticas	4 311 971	Applied Biosystems	–	sim
Tubos de reação óticos	Tubos óticos <i>ABI PRISM</i> , 8 tubos/tira	4 316 567	Applied Biosystems	sim	–
Tubos de reação óticos	Tubos óticos MicroAmp®	N8010933	Applied Biosystems	sim	–
Tampas óticas (planas)	Tampas óticas <i>ABI PRISM</i> , 8 tampas/tira	4 323 032	Applied Biosystems	–	não

Atenção: A utilização de tubos de reação para análises óticas com tampas convexas só é permitida para o instrumento *ABI PRISM 7700 SDS* e requer um ajuste do tempo de exposição (ver **8.6.2 Programação do *ABI PRISM 7700 SDS*, 8.6.2.5 Definições adicionais importantes**).

Ao preparar a PCR, certificar-se de que são executados em paralelo, no mínimo, um *Padrão de quantificação* por ensaio de PCR, assim como um controlo negativo (*água, grau de PCR*). Para gerar uma curva padrão, utilizar, por cada ensaio de PCR, todos os *padrões de quantificação* fornecidos (*CMV LC/RG/TM QS 1 – 4*).

* Ao utilizar a armação de suporte de duas peças, é necessário abrir os tubos de reação na introdução e na remoção dos mesmos. Para evitar contaminações devido a este procedimento, utilizar exclusivamente a parte inferior da armação de suporte.

Atenção: De modo a assegurar uma curva padrão, é veementemente recomendado complementar a Master Mix utilizada para os *padrões de quantificação* com a respetiva quantidade de *controlo interno* (ver **8.4 Quantificação**). Antes de cada utilização, todos os reagentes têm de ser completamente descongelados, misturados (por pipetagem repetida para cima e para baixo ou por ação rápida do vórtex) e brevemente centrifugados.

Se se pretender utilizar o *Controlo interno para controlar o procedimento de isolamento de ADN e verificar uma possível inibição de PCR*, já deverá ter sido adicionado ao isolamento (ver **8.3 Controlo interno**). Neste caso, utilizar o seguinte esquema de pipetagem (ver esquema reproduzido na Fig. 1):

		Número de amostras	
		1	12
1. Preparação da Master Mix	CMV TM Master	25 µl	300 µl
	CMV LC/RG/TM Mg-Sol	5 µl	60 µl
	CMV TM IC	0 µl	0 µl
	Volume total	30 µl	360 µl
2. Preparação do ensaio por PCR	Master Mix	30 µl	30 µl cada
	Amostra	20 µl	20 µl cada
	Volume total	50 µl	50 µl cada

Se se pretender utilizar o *controlo interno exclusivamente para o controlo de uma inibição da PCR*, adicioná-lo diretamente ao *CMV TM Master*. Neste caso, utilizar o seguinte esquema de pipetagem (ver esquema reproduzido na Fig. 2):

		Número de amostras	
		1	12
1. Preparação da Master Mix	CMV TM Master	25 µl	300 µl
	CMV LC/RG/TM Mg-Sol	5 µl	60 µl
	CMV TM IC	2 µl	24 µl
	Volume total	32 µl*	384 µl
2. Preparação do ensaio por PCR	Master Mix	30 µl	30 µl cada
	Amostra/CMV LC/RG/TM QS 1 – 4	20 µl	20 µl cada
	Volume total	50 µl	50 µl cada

Pipetar 30 µl da Master Mix para cada tubo de reação de PCR ou poço da placa de reação de 96 poços. De seguida, adicionar 20 µl de eluído do isolamento de ADN. Misturar devidamente a solução pipetando para cima e para baixo várias vezes. Tapar os tubos de reação com as tampas correspondentes ou, ao utilizar uma placa de reação de 96 poços, como alternativa, tapar com folhas selantes óticas (*Optical Adhesive*). Para concentrar o volume de reação preparado no fundo dos tubos ou dos poços, centrifugar os tubos de reação (num suporte de conservação concebido para tubos de PCR) ou a placa de reação de 96 poços numa centrífuga com rotor para placas de microtitulação durante 30 segundos a 1780 x g (4000 rpm). Caso não exista uma centrífuga deste género disponível, certificar-se de que a Master Mix e o volume de amostras são pipetados no fundo dos tubos de reação ou no fundo das unidades de reação (poços). Conservar as reações preparadas a +4 °C até o instrumento *ABI PRISM SDS* estar programado (ver **8.6 Programação do ABI PRISM SDS**) e, em seguida, transferi-las para o aparelho.

Atenção:

- Ao utilizar tubos de reação óticos em combinação com tampas óticas, colocar sempre uma armação de suporte (*96Well Tray/Retainer Set*) no instrumento (*ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS*). Ao utilizar a armação de suporte de duas peças, é necessário abrir os tubos de reação durante a introdução e a remoção dos mesmos. Para evitar contaminações devido a este procedimento, utilizar exclusivamente a parte *inferior* da armação de suporte.
- A utilização de placas de reação óticas de 96 poços em combinação com folhas selantes óticas requer a cobertura com uma almofada de compressão (*Optical Cover Compression Pads*).

* O aumento de volume causado através da adição de *controlo interno* é desprezável na preparação do ensaio por PCR. A sensibilidade do sistema de deteção não é afetada.

Adição do *controle interno* para a purificação

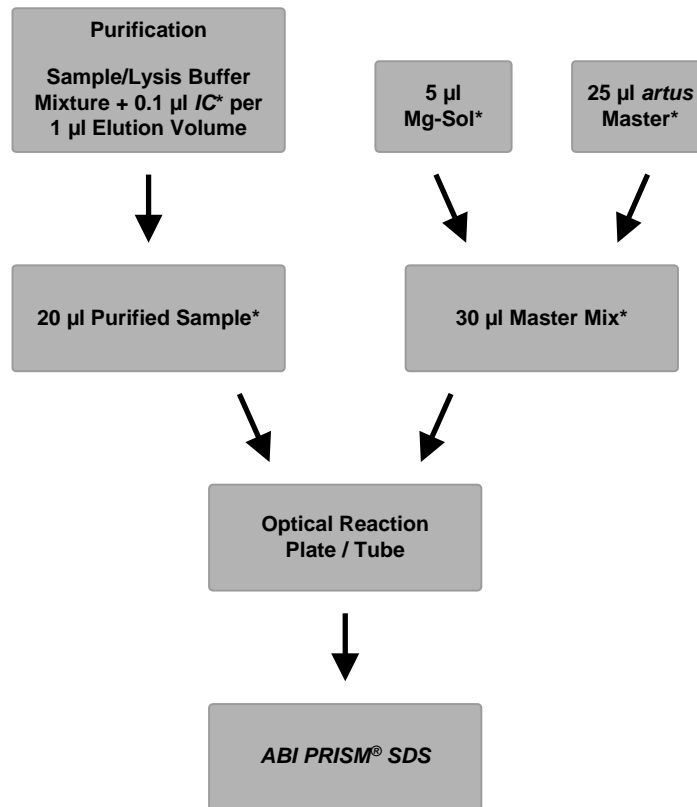


Fig. 1: Fluxo esquemático da operação para o controle da purificação e da inibição da PCR.

*Certificar-se de que as soluções estão totalmente descongeladas, bem misturadas e brevemente centrifugadas.

Adição do *controle interno* no *artus* Master

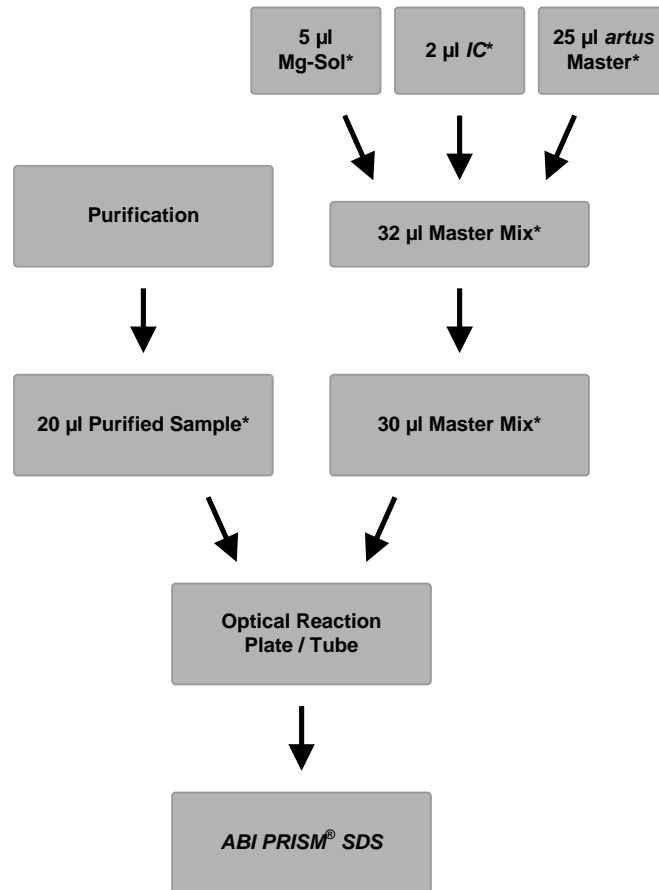


Fig. 2: Fluxo esquemático da operação para o controle da inibição da PCR.

*Certificar-se de que as soluções estão totalmente descongeladas, bem misturadas e brevemente centrifugadas.

8.6 Programação do ABI PRISM SDS

O software dos ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT Sequence Detection Systems (SDS) necessita de algumas informações adicionais antes do início do ensaio de PCR. Os modos de procedimento na programação dos aparelhos divergem consideravelmente uns dos outros, razão pela qual estes são tratados, a seguir, em capítulos separados.

8.6.1 Programação do ABI PRISM 7000 SDS

Para a detecção de ADN do CMV, criar um perfil no ABI PRISM 7000 SDS de acordo com os seis passos seguintes (8.6.1.1 – 8.6.1.6). Todas as especificações estão relacionadas com a versão 1.0.1 do software do ABI PRISM 7000 SDS. Para mais informações sobre a programação do ABI PRISM 7000 SDS, consultar o Guia do utilizador do ABI PRISM 7000 SDS. Para facilitar, estas configurações estão destacadas nas figuras com caixa a negro.

8.6.1.1 Predefinições para a criação de um novo ensaio de PCR

Selecionar no ABI PRISM 7000 SDS o item *New* do menu *File* e programar as seguintes definições iniciais para o novo documento (ver a Fig. 3). Um modelo guardado anteriormente (*SDS Template* [*.sdf]) encontra-se disponível na lista *Template* ou pode ser selecionado através da função *Browse* (ver 8.6.1.5 Guardar o ensaio de PCR). Confirmar as predefinições (OK).

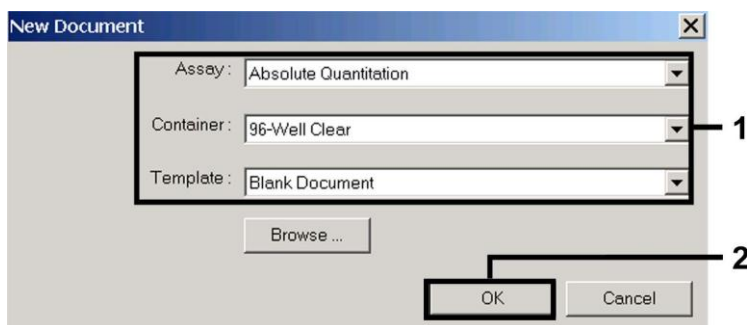


Fig. 3: Predefinições para a criação de um novo ensaio de PCR (*New Document*).

8.6.1.2 Criação/seleção dos detetores

Com a ajuda do submenu *Detector Manager* do menu *Tools*, atribuir os corantes de detecção correspondentes ao ficheiro. Para a detecção de ADN do CMV, assim como do controlo interno, com o kit *artus CMV TM PCR*, devem ser definidos os repórteres/corantes de extinção indicados na seguinte tabela:

Deteção	Repórter	Corante de extinção
ADN do CMV	FAM	nenhum
Controlo interno (CMV TM IC)	VIC	nenhum

Para a criação destes detetores, seleccionar a opção *File* (canto inferior esquerdo do *Detector Manager*) e, a seguir, a opção *New*.

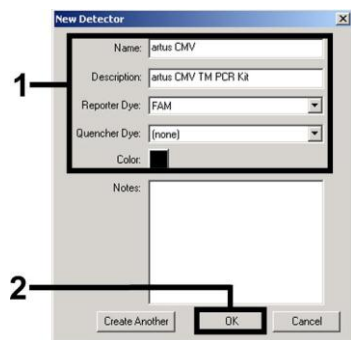


Fig. 4: Criação do detetor específico do CMV (*Detector Manager*).

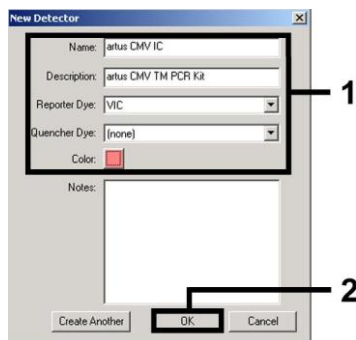


Fig. 5: Criação do detetor específico do IC (*Detector Manager*).

Para a detecção de ADN do CMV, definir a combinação de repórter/corante de extinção **FAM/none** na nova janela. Para a detecção do *controlo interno*, seleccionar a combinação **VIC/none** (tal como mostrado na Fig. 4 e Fig. 5). Ao confirmar as definições (OK), retornará ao *Detector Manager*. Marcar os recém criados detetores e transferir cada seleção para *Well Inspector*, clicando na opção *Add to Plate Document* (ver Fig. 6). Fechar a janela (*Done*).

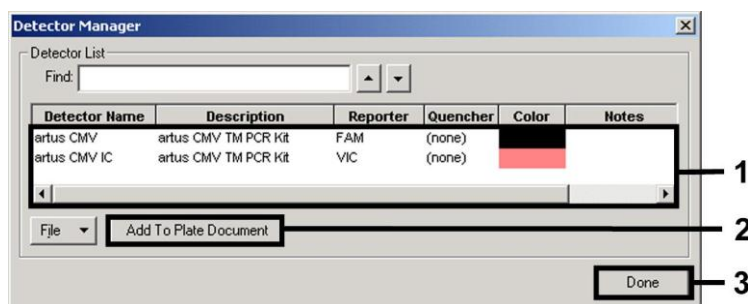


Fig. 6: Seleção dos detetores (*Detector Manager*).

8.6.1.3 Atribuição das informações necessárias às posições das placas

Abrir a opção *Well Inspector* no menu *View* para localizar os detetores seleccionados em 8.6.1.2 (ver Fig. 7).

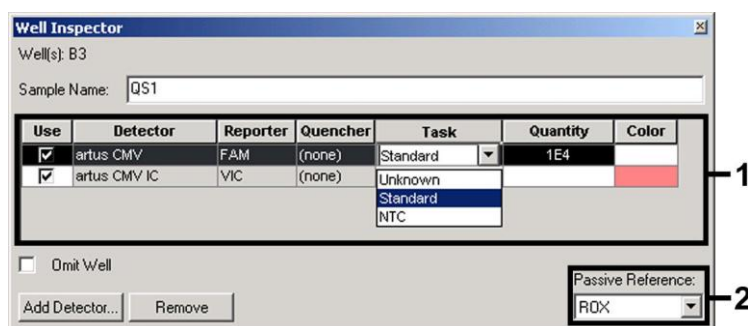


Fig. 7: Correspondência das informações necessárias às posições das placas (*Well Inspector*).

Marcar as posições das placas ocupadas para a detecção de ADN do CMV. Fazer corresponder a estas posições os detetores seleccionados, ativando com um clique a opção *Use* de ambos os detetores. Aparecerá um sinal de marcação. Para a denominação de cada preparação de reação, seleccionar a posição correspondente na placa e introduzir o nome (*Sample Name*). Ter em atenção que as preparações com um *Sample Name* idêntico e uma atribuição do detetor idênticas são reconhecidas pelo software como réplica e, de acordo com a sua carga de agente patogénico quantificada, é calculada a média. Seleccionar então para cada tipo de amostras a função correspondente (*Task*) de acordo com a seguinte tabela:

Tipo de amostra	Função (Task)	Concentração (Quantity)	Repórter	Corante de extinção
Amostra	Desconhecido	–	FAM	nenhum
Controlo sem modelo	NTC	–	FAM	nenhum
Padrão	Padrão	ver 1. Conteúdo	FAM	nenhum

Para a criação de uma curva padrão, utilizar todos os *padrões de quantificação* fornecidos (*CMV LC/RG/TM QS 1 – 4*) por ensaio de PCR e introduzir as concentrações correspondentes (ver 1. **Conteúdo**) para cada padrão (*Quantity*). Ter em atenção que, para um ensaio de PCR com o kit *artus CMV TM PCR*, o **ROX™** tem de ser definido como referência passiva (*Passive Reference*). A distribuição uniforme do corante ROX em todas as preparações de PCR de um lote, por meio da mistura de *CMV TM Master*, garante o reconhecimento e o cálculo das variações tubetotube (diferenças de fluorescência entre diversas reações da PCR) através do *Sequence Detection Software* (normalização).

8.6.1.4 Criação do perfil de temperatura

Para criar um perfil de temperatura, mudar do nível *Setup* para o nível *Instrument* no software. Introduzir o perfil de temperatura específico para a detecção de ADN do CMV de acordo com a Fig. 8. Para retirar o passo de 50 °C gravado nas predefinições, marcá-lo com a ajuda do botão esquerdo do rato, mantendo simultaneamente a tecla Shift premida, e apagá-lo, em seguida, utilizando a tecla Backspace. Assegurar que o volume de reação está regulado para 50 µl. A opção *9600 Emulation* deve estar ativada e as predefinições de *Auto Increment* devem permanecer inalteradas (*Auto Increment*: 0.0°C, 0.0 Seconds).

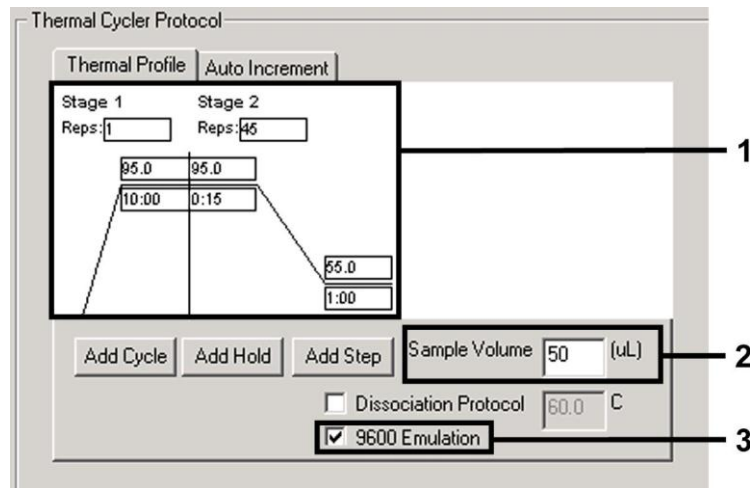


Fig. 8: Criação do perfil de temperatura.

8.6.1.5 Guardar o ensaio de PCR

Guardar as definições introduzidas (*Setup*) como modelo, de modo a que possam ser reutilizadas, seja na versão original ou com modificações. Ao guardar as definições como um *SDS Template (*.sdt)* na pasta *Template Directory* (Disco Local [C:] \Program Files\ABI PRISM 7000\Templates, criado pela Applied Biosystems), é possível selecionar este ficheiro na lista suspensa do *Template*, diretamente na janela *New Document* (novo documento). As cópias guardadas em outras pastas têm de ser abertas com *Browse*. Antes de iniciar o ensaio de PCR, guardá-lo novamente como um *SDS Document (*.sds)*. Desta forma, o armazenamento dos dados obtidos no decurso da PCR é garantido.

8.6.1.6 Início do ensaio de PCR

Iniciar o ensaio de PCR selecionando a opção *Start* no item *Instrument* do menu ou o campo *Start* no nível *Instrument*.

8.6.2 Programação do ABI PRISM 7700 SDS

Para a detecção de ADN do CMV, criar um perfil no *ABI PRISM 7700 SDS* de acordo com os sete passos seguintes (8.6.2.1 8.6.2.7). Todas as especificações estão relacionadas com a versão 1.9.1 do software do *ABI PRISM 7700 SDS*. Para mais informações sobre a programação do *ABI PRISM 7700 SDS*, consultar o *Manual do Utilizador do ABI PRISM 7700 SDS*. Para facilitar, estas configurações estão destacadas nas figuras com caixa a negro.

8.6.2.1 Predefinições para a criação de um novo ensaio de PCR

Selecionar no *ABI PRISM 7700 SDS* o item *New Plate* do menu *File* e programar as seguintes definições iniciais para o novo documento (ver Fig. 9). Confirmar as predefinições (*OK*).

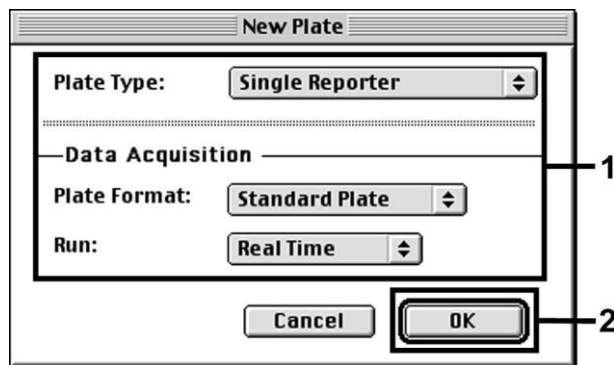


Fig. 9: Predefinições para a criação de um novo ensaio de PCR (*New Plate*).

8.6.2.2 Seleção dos corantes fluorescentes e coordenação do tipo de amostras

Com a ajuda de *Sample Type Setup* (nível *Setup: Sample Type/Sample Type Setup*) atribuir os corantes de deteção correspondentes e o tipo de amostra correspondente ao ficheiro. Para a deteção de ADN do CMV, assim como do *controlo interno*, com o kit *artus CMV TM PCR*, devem ser definidos os repórteres/corantes de extinção indicados na seguinte tabela:

Deteção	Repórter	Corante de extinção
ADN do CMV	FAM	nenhum
<i>Controlo interno (CMV TM IC)</i>	JOE	nenhum

Para a análise de ADN do CMV com o kit *artus CMV TM PCR*, seleccionar o corante do repórter **FAM** como indicado na tabela. Isto é válido para padrões (STND), amostras (UNKN) e também para controlos sem modelo (UNKN). Para a análise do *controlo interno* (IPC+), definir **JOE** como repórter. Definir o corante de extinção para **none**. A atribuição dos corantes e dos tipos de amostras na janela *Sample Type Setup* está representada na Fig. 10.

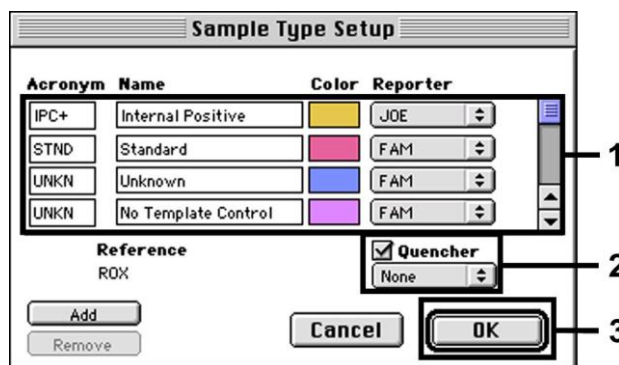


Fig. 10: Seleção dos corantes fluorescentes e definição do tipo de amostras (*Sample Type Setup*).

Atribuir o tipo de amostra a uma função correspondente (*Acronym*) de acordo com a seguinte tabela:

Tipo de amostra	Função (Acronym)	Concentração (Quantity)	Repórter	Corante de extinção
Amostra	UNKN	–	FAM	nenhum
Controlo sem modelo	UNKN	–	FAM	nenhum
Padrão	STND	ver 1. Con teúdo	FAM	nenhum

8.6.2.3 Atribuição das informações necessárias às posições das placas

Para atribuir os detetores e os tipos de amostras a cada posição das placas, seleccionar os respetivos campos. Abrir, então, no nível *Setup*, a janela de diálogo *Dye Layer* e atribuir o repórter correspondente. Ao ativar o menu de contexto *Sample Type*, é possível encontrar os tipos de amostras atribuídos ao repórter em *Sample Type Setup* na lista que aparece (ver Fig. 11).

Selecionar o tipo de amostra adequado (ver tabela em 8.6.2.2) e atribuir as restantes posições das placas com a ajuda do *Dye Layer* e do menu *Sample Type*. No campo *Sample Name*, pode ser atribuído um nome a cada amostra. A média dos campos definidos como *Replicate* (introdução do nome da amostra de referência na coluna *Replicate*) é calculada pelo software de acordo com a carga de agente patogénico quantificada e com ela é calculado o desvio padrão.

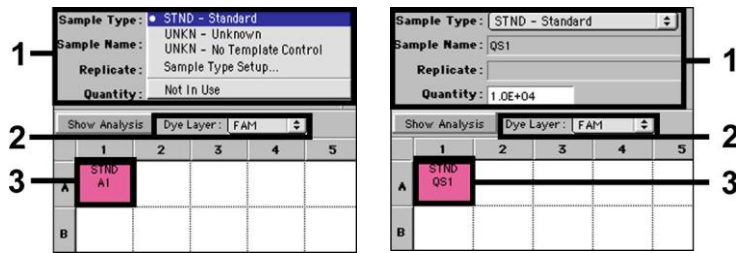


Fig. 11/12: Atribuições das informações necessárias às posições das placas.

Para a criação de uma curva padrão, utilizar todos os *padrões de quantificação* fornecidos (*CMV LC/RG/TM QS 1 – 4*) por ensaio de PCR e introduzir as concentrações correspondentes (ver 1.. **Conteúdo**) para cada padrão no campo *Quantity* (ver a Fig. 12). Isto, porém, só é possível se as posições ocupadas com os padrões tiverem sido previamente definidas como tal com ajuda do menu *Sample Type*.

8.6.2.4 Criação do perfil de temperatura

Para criar um perfil de temperatura, mudar para o menu *Thermal Cycler Conditions* no nível *Setup*. Introduzir o perfil de temperatura específico para a deteção de ADN do CMV de acordo com a Fig. 13. Assegurar que o volume de reação está regulado para 50 µl. As predefinições dos tempos *Ramp* e de *Auto Increment* devem permanecer inalteradas (*Ramp Time*: 0:00, *Auto Increment*: 0.0°C, 0.0 Seconds).

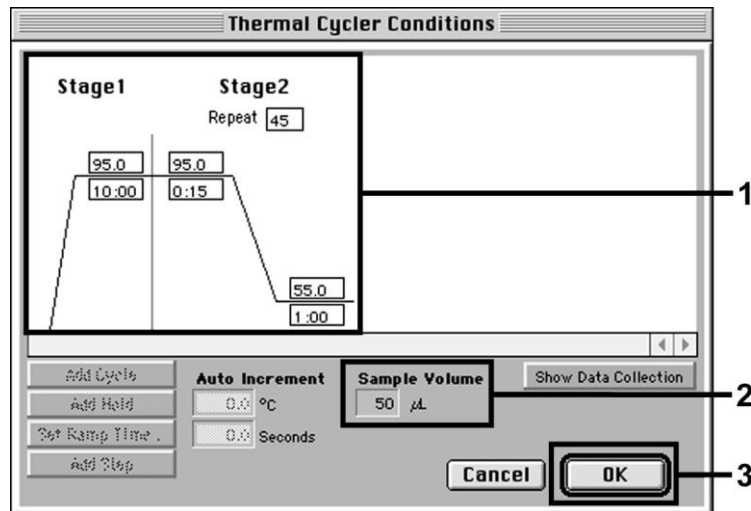


Fig. 13: Criação do perfil de temperatura.

Além disso, a opção *Show Data Collection* encontra-se no menu *Thermal Cycler Conditions*. Ao selecionar esta opção, aparecerá a janela representada na Fig. 14. Cada temperatura *Ramp* e *Plateau* possui um ícone de aquisição de dados (*Data Collection Icon*) que demonstra a aquisição dos dados nesta fase do ensaio. Para evitar medições de fluorescência desnecessárias, remover todos os símbolos, exceto o símbolo do passo *Annealing* (*Stage2*/passo 2). Desta forma, é possível reduzir ao mínimo o tempo total do ensaio e a quantidade de dados.

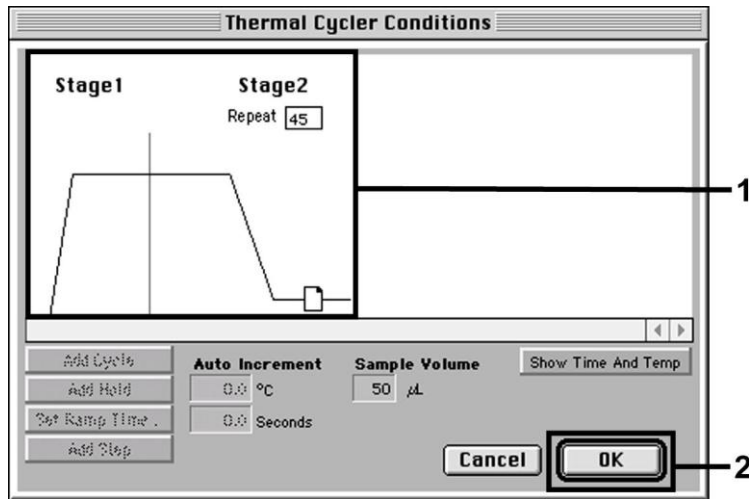


Fig. 14: Aquisição de dados.

8.6.2.5 Definições adicionais importantes

Para selecionar o tempo de exposição (estímulo dos corantes fluorescentes), assim como para selecionar os ficheiros *Pure Spectra/Background*, mudar do nível *Setup* para o nível *Analysis*. Selecionar o subitem *Advanced Options* ativado, que se encontra no item *Diagnostics* no menu *Instrument*. Efetuar as definições de acordo com a Fig. 15. Ao desativar a função opcional *Spectra Components (Analysis)*, são automaticamente utilizados, durante a nova avaliação dos ensaios já analisados, os ficheiros de calibração atuais, arquivados na pasta *Spectra Components* no momento da criação dos dados. Para analisar ensaios antigos com a utilização do novo *Spectra Components* introduzido, ative estes dois campos. Ter em atenção que, para um ensaio de PCR com o kit *artus CMV TM PCR*, o **ROX** tem de estar definido como referência passiva (*Reference*). A distribuição uniforme do corante ROX em todas as preparações da PCR de um lote, por meio da mistura de *CMV TM Master*, garante o reconhecimento e o cálculo das variações tubetotube (diferenças de fluorescência entre diversas preparações da PCR) através do *Sequence Detection Software* (normalização).

Atenção: O tempo de exposição na utilização de placas de reação de 96 poços para medições óticas, em combinação com folhas selantes óticas ou com tubos de reação óticos com tampas planas, é de dez milésimos de segundo. Se utilizar **tubos de reação com tampas convexas**, aumentar o tempo de exposição para **25 milésimos de segundo**.

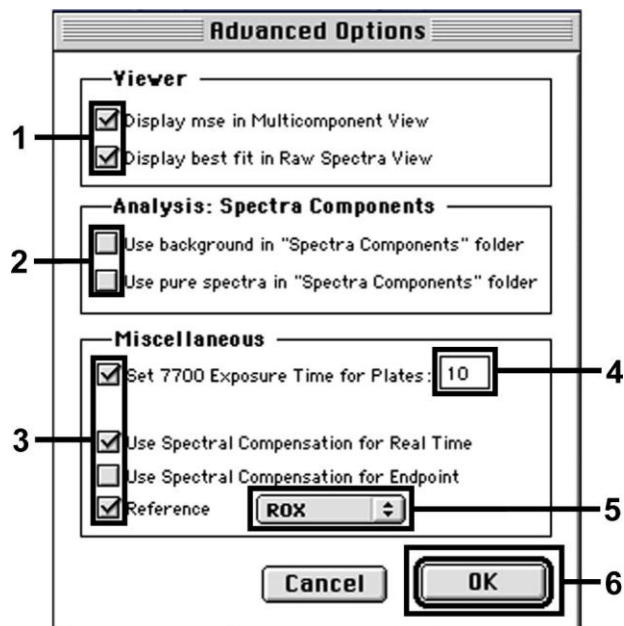


Fig. 15: Definições adicionais importantes (*Advanced Options*).

8.6.2.6 Guardar o ensaio de PCR

Guardar as definições introduzidas (*Setup*) como modelo, de modo a que possam ser reutilizadas, seja na versão original ou com modificações. Para tal, guardar este ficheiro em *Stationary File Format*. Antes de iniciar o ensaio de PCR atualmente programado, certificar-se de que o mesmo é novamente guardado como *Normal File Format* para garantir que os dados obtidos no decurso da PCR são guardados.

8.6.2.7 Início do ensaio de PCR

Iniciar o ensaio de PCR selecionando a opção *Run* no item *Instrument* do menu ou o campo *Run* no nível *Analysis*.

8.6.3 Programação do ABI PRISM 7900HT SDS

Para a deteção de ADN do CMV, criar um perfil no *ABI PRISM 7900HT SDS* de acordo com os seis passos seguintes (8.6.3.1 – 8.6.3.6). Todas as especificações estão relacionadas com a versão 2.1 do software do *ABI PRISM 7900HT SDS*. Para mais informações sobre a programação do *ABI PRISM 7900HT SDS*, consultar o *Guia do Utilizador do ABI PRISM 7900HT SDS*. Para facilitar, estas configurações estão destacadas nas figuras com caixa a negro.

8.6.3.1 Predefinições para a criação de um novo ensaio de PCR

Selecionar no *ABI PRISM 7900HT SDS* o item *New* do menu *File* e programar as seguintes definições iniciais para o novo documento (ver a Fig. 16). Um modelo guardado anteriormente (*ABI PRISM SDS Template Document [*.sdf]*) encontra-se disponível na lista *Template* ou pode ser selecionado através da função *Browse* (ver 8.6.3.5 Guardar o ensaio de PCR). Confirmar as predefinições (*OK*).

Atenção: O kit *artus CMV TM PCR* não pode ser utilizado com o *ABI PRISM 7900HT SDS* com placas de formato 384.

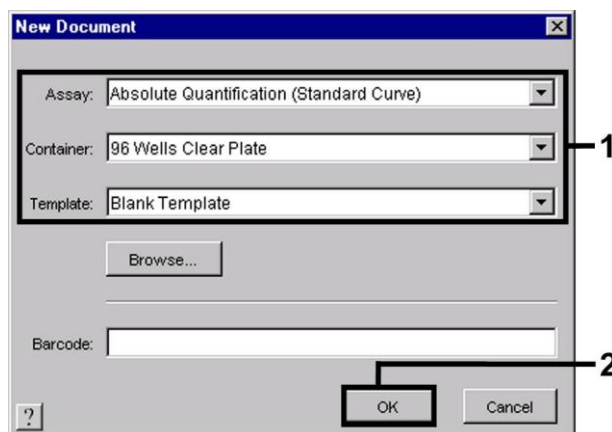


Fig. 16: Predefinições para a criação de um novo ensaio de PCR (*New Document*).

8.6.3.2 Criação/seleção dos detetores

Com a ajuda do submenu *Detector Manager* do menu *Tools* (alternativa: nível *Setup*/função *Add Detector*), atribuir os corantes de deteção correspondentes ao ficheiro. Para a deteção de ADN do CMV, assim como do *controlo interno*, com o kit *artus CMV TM PCR*, devem ser definidos os repórteres/corantes de extinção indicados na seguinte tabela:

Deteção	Repórter	Corante de extinção
ADN do CMV	FAM	Não fluorescente
<i>Controlo interno (CMV TM IC)</i>	VIC	Não fluorescente

Para a criação destes detetores, selecionar a opção *New* (canto inferior esquerdo do *Detector Manager*).

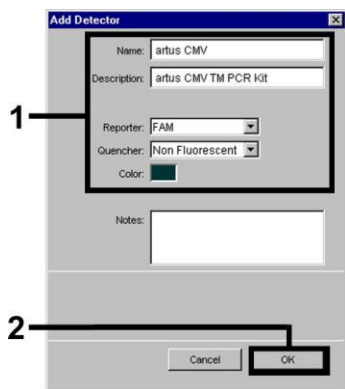


Fig. 17: Criação do detetor específico do CMV (*Detector Manager*).

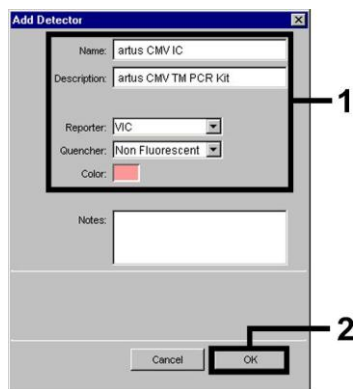


Fig. 18: Criação do detetor específico do IC (*Detector Manager*).

Para a deteção de ADN do CMV, definir a combinação de repórter/corante de extinção **FAM/Non Fluorescent** na nova janela. Para a deteção do *controlo interno*, seleccionar a combinação **VIC/Non Fluorescent** (tal como mostrado na Fig. 17 e Fig. 18). Ao confirmar as definições (OK), retornará ao *Detector Manager*. Marcar os recém criados detetores e transferir cada seleção para o nível *Setup*, clicando na opção *Copy to Plate Document* (ver a Fig. 19). Fechar a janela (*Done*).

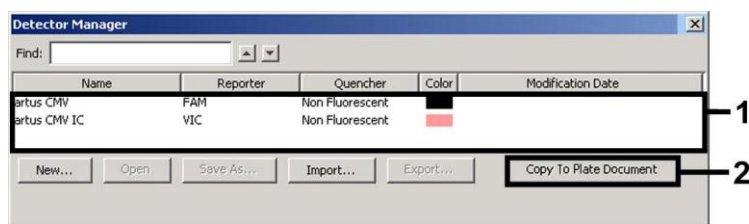


Fig. 19: Seleção dos detetores (*Detector Manager*).

8.6.3.3 Atribuição das informações necessárias às posições das placas

Depois de fechar o *Detector Manager* (*Done*), é possível encontrar os detetores seleccionados em 8.6.3.2 no nível *Setup*, listados numa tabela (ver a Fig. 20).

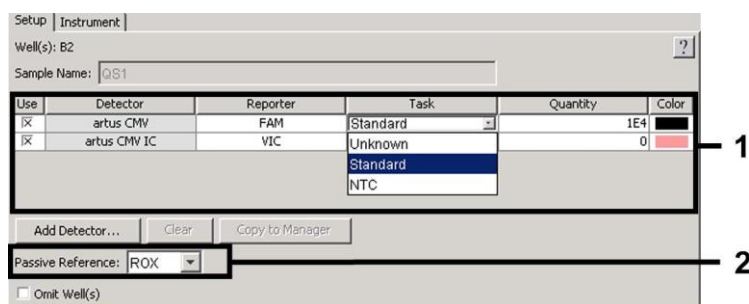


Fig. 20: Atribuições das informações necessárias às posições das placas.

Marcar as posições das placas ocupadas para a deteção de ADN do CMV. Fazer corresponder a estas posições os detetores seleccionados, ativando com um clique a opção *Use* de ambos os detetores. Aparecerá uma cruz. Para a denominação de cada preparação de reacção, seleccionar a posição correspondente na placa e introduzir o nome (*Sample Name*). Ter em atenção que as preparações com um *Sample Name* idêntico e uma atribuição do detetor idênticas são reconhecidas pelo software como réplica e, de acordo com a sua carga de agente patogénico quantificada, é calculada a média. Seleccionar então para cada tipo de amostras a função correspondente (*Task*) de acordo com a seguinte tabela:

Tipo de amostra	Função (Task)	Concentração (Quantity)	Repórter	Corante de extinção
Amostra	Desconhecido	–	FAM	Não fluorescente
Controlo sem	NTC	–	FAM	Não

modelo				fluorescente
Padrão	Padrão	ver 1. . Con teúdo	FAM	Não fluorescente

Para a criação de uma curva padrão, utilizar todos os *padrões de quantificação* fornecidos (*CMV LC/RG/TM QS 1 – 4*) por ensaio de PCR e introduzir as concentrações correspondentes (ver **1.. Conteúdo**) para cada padrão (*Quantity*). Ter em atenção que, para um ensaio de PCR com o kit *artus CMV TM PCR*, o **ROX** tem de ser definido como referência passiva (*Passive Reference*). A distribuição uniforme do corante ROX em todas as preparações de PCR de um lote, por meio da mistura de *CMV TM Master*, garante o reconhecimento e o cálculo das variações tubetotube (diferenças de fluorescência entre diversas reações da PCR) através do *Sequence Detection Software* (normalização).

8.6.3.4 Criação do perfil de temperatura

Para criar um perfil de temperatura, mudar do nível *Setup* para o nível *Instrument* no software. Introduzir o perfil de temperatura válido para a detecção de ADN do CMV de acordo com a Fig. 21. Assegurar que o volume de reação está regulado para 50 µl. A opção *9600 Emulation* deve estar ativada e as predefinições do tempo de *Ramp* e de *Auto Increment* devem permanecer inalteradas (*Ramp Time: 0:00, Auto Increment: 0.0°C, 0.0 Seconds*).

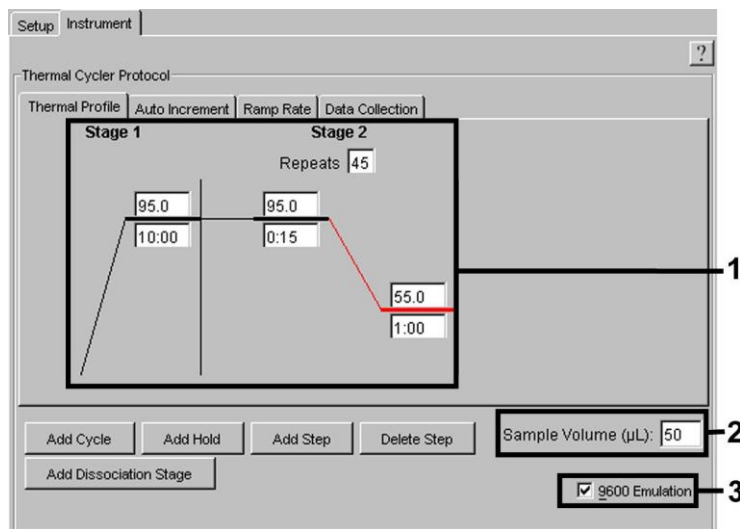


Fig. 21: Criação do perfil de temperatura.

Além disso, a opção *Data Collection* encontra-se no nível *Instrument*. Ao selecionar esta opção, aparecerá a janela representada na Fig. 22. Cada temperatura *Ramp* e *Plateau* possui um ícone de aquisição de dados (*Data Collection Icon*), que demonstra a aquisição dos dados nesta fase do ensaio. Para evitar medições de fluorescência desnecessárias, remover, clicando com o rato, todos os símbolos, exceto o símbolo do passo *Annealing* (*Stage2*/passo 2). Desta forma, é possível reduzir ao mínimo o tempo total do ensaio e a quantidade de dados.

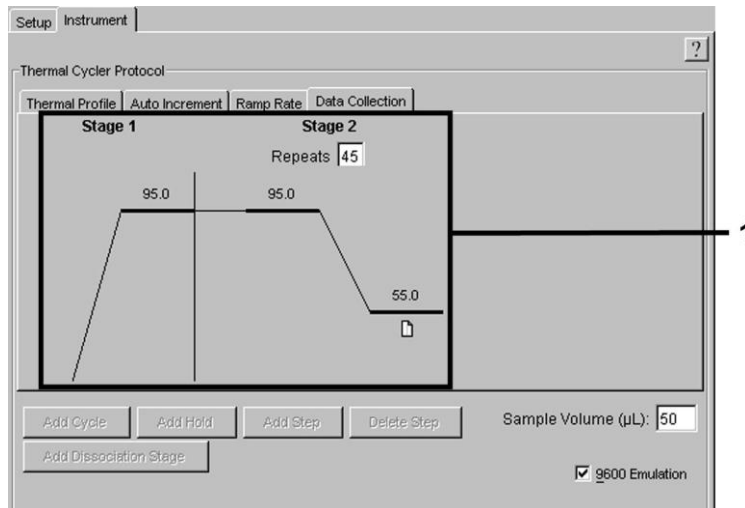


Fig. 22: Aquisição de dados.

8.6.3.5 Guardar o ensaio de PCR

Guardar as definições introduzidas (*Setup*) como modelo, de modo a que possam ser reutilizadas, seja na versão original ou com modificações. Ao guardar as definições como *ABI PRISM SDS Template (*.sdt)*, na pasta *Template Directory* ([D:]Program Files\Applied Biosystems\ SDS 2.1\Templates, criada pela Applied Biosystems), é possível selecionar este ficheiro na lista *Template* diretamente na janela *New Document*. As cópias guardadas em outras pastas têm de ser abertas com *Browse*. Antes de iniciar o ensaio de PCR, guardá-lo novamente como um *ABI PRISM SDS Document (*.sds)*. Desta forma, o armazenamento dos dados obtidos no decurso da PCR é garantido.

8.6.3.6 Início do ensaio de PCR

Iniciar o ensaio de PCR selecionando a opção *Start* no item de menu *Instrument*.

9. Análise de dados

Uma calibração válida do corante (*Pure Spectra Component File*) e do fundo (*Background Component File*) é indispensável ao colocar o aparelho em funcionamento. Estes ficheiros de calibração são utilizados para um cálculo exato dos resultados da seguinte forma:

Todos os sinais de interferência gerados pelos instrumentos que influenciam a medição são eliminados pelo *Sequence Detection Software* dos *ABI PRISM Sequence Detection Systems* com a ajuda do *Background Component File*.

Além disso, surgem nas análises multicolor interferências entre os espectros de emissão de cada corante fluorescente. O software do *ABI PRISM SDS* compensa estas interferências através de cálculos, utilizando os dados espectrais de cada corante guardados no *Pure Spectra Component File*. O software utiliza o mesmo ficheiro para a atribuição dos dados de fluorescência, recolhidos no decurso da PCR através do espectro total mensurável, para aos detetores programados. Em seguida, os dados de fluorescência de cada corante são divididos pelo valor obtido para o sinal de referência passivo (ROX) para compensação das variações tube-to-tube (diferenças de fluorescência entre diferentes preparações da PCR). Deste modo, os sinais normalizados podem ser avaliados com ajuda do *Amplification Plot*.

Os ficheiros de calibração utilizados na avaliação de um ensaio de PCR são protegidos automaticamente a guardar o ensaio. Se não tiverem sido instalados quaisquer **ficheiros de calibração**, criá-los seguindo as instruções do *Guia do Utilizador/Manual do ABI PRISM SDS*.

Caso tenha sido integrado mais que um sistema *artus* TM PCR no ensaio de PCR (**ter em atenção o perfil de temperatura**), analisar estes ensaios separadamente. As preparações com um *Sample Name* idêntico e uma atribuição do detetor idênticas são automaticamente reconhecidas como réplicas pelo *ABI PRISM 7000 e 7900HT SDS Software* e, de acordo com a sua carga de agente patogénico quantificada, é calculada a média.

Para a análise dos ensaios quantitativos, seguir as instruções fornecidas em **8.4 Quantificação** e na **Technical Note for quantitation on the ABI PRISM 7000 SDS** (Nota técnica para quantificação no instrumento **ABI PRISM 7000 SDS**) em www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Caso tenha sido integrado mais do que um sistema artus herpes no ensaio de PCR, analisar estes diferentes sistemas com os padrões de quantificação correspondentes separadamente. Selecionar as posições de amostra para a análise em conformidade.

Os seguintes resultados podem ser obtidos:

1. É detetado um sinal no canal de fluorescência FAM.

O resultado da análise é positivo: A amostra contém ADN do CMV.

Neste caso, a deteção de um sinal de fluorescência VIC/JOE (*controlo interno*) é dispensável, pois elevadas concentrações iniciais de ADN do CMV (sinal positivo no canal de fluorescência FAM) podem conduzir a uma redução ou até mesmo à ausência do sinal de fluorescência do *controlo interno* (competição).

2. Não é detetado qualquer sinal de fluorescência FAM. Aparece, simultaneamente, um sinal de fluorescência VIC/JOE proveniente do *controlo interno*.

Não é detetável ADN de CMV na amostra. Pode ser considerada negativa.

No caso de uma PCR negativa para CMV, o sinal detetado do *controlo interno* exclui a possibilidade de inibição da PCR.

3. Não é detetado nenhum sinal de fluorescência FAM e nenhum sinal de fluorescência VIC/JOE.

Não é possível fazer uma avaliação diagnóstica.

É possível encontrar informações sobre fontes de erros e respetivas soluções em **10. Resolução** de problemas.

Exemplos de reações de PCR positivas e negativas estão reproduzidos nas figuras 23/24 (**ABI PRISM 7000 SDS**), 25/26 (**ABI PRISM 7700 SDS**) e 27/28 (**ABI PRISM 7900HT SDS**).

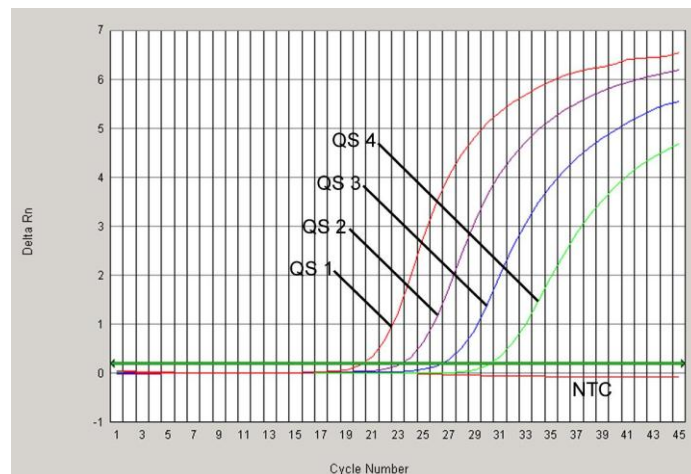


Fig. 23: Deteção dos padrões de quantificação (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4) através da deteção de um sinal de fluorescência FAM (**ABI PRISM 7000 SDS**). NTC: controlo sem modelo (controlo negativo).

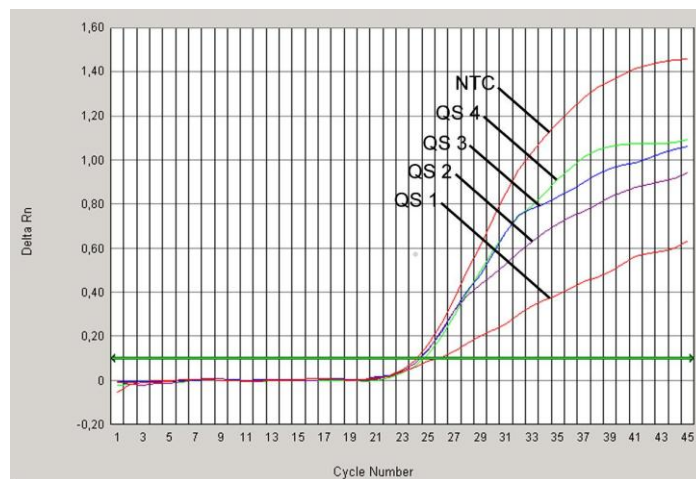


Fig. 24: Detecção do *controle interno* (IC) através da medição do sinal de fluorescência VIC (**ABI PRISM 7000 SDS**) no caso de amplificação simultânea dos *padrões de quantificação* (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4). NTC: controle sem modelo (controle negativo).

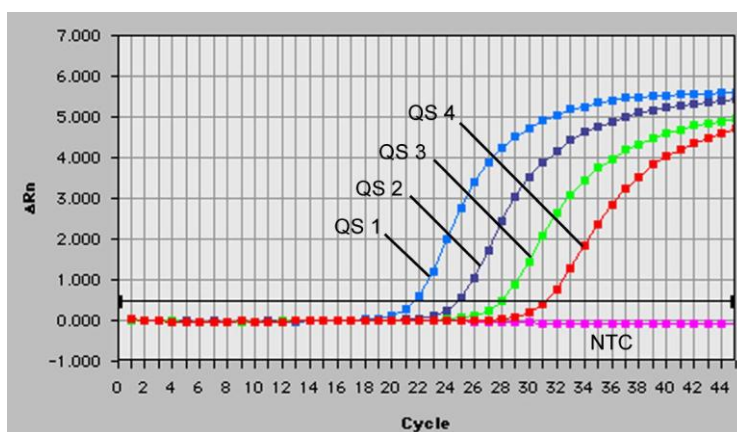


Fig. 25: Detecção dos *padrões de quantificação* (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4) através da detecção de um sinal de fluorescência FAM (**ABI PRISM 7700 SDS**). NTC: controle sem modelo (controle negativo).

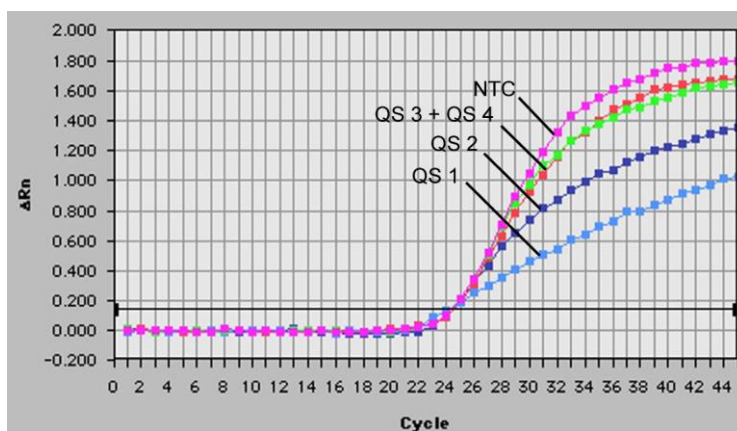


Fig. 26: Detecção do *controle interno* (IC) através da medição do sinal de fluorescência JOE (**ABI PRISM 7700 SDS**) no caso de amplificação simultânea dos *padrões de quantificação* (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4). NTC: controle sem modelo (controle negativo).

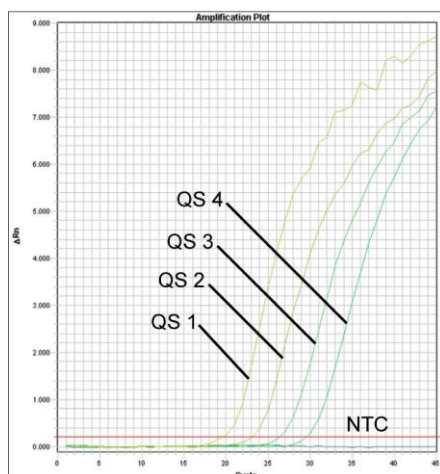


Fig. 27: Detecção dos *padrões de quantificação* (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4) através da deteção de um sinal de fluorescência FAM (ABI PRISM 7900HT SDS). NTC: controlo sem modelo (controlo negativo).

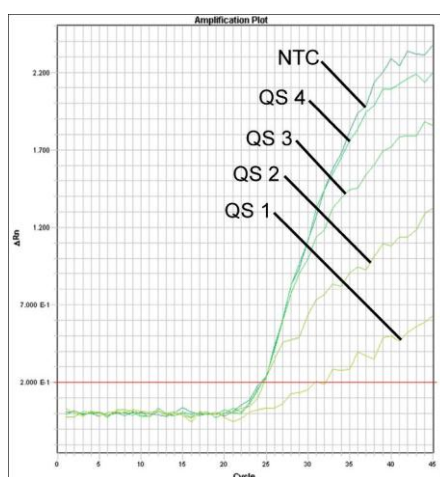


Fig. 28: Detecção do *controlo interno* (IC) através da medição do sinal de fluorescência VIC (ABI PRISM 7900HT SDS) no caso de amplificação simultânea dos *padrões de quantificação* (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4). NTC: controlo sem modelo (controlo negativo).

10. Resolução de problemas

Ausência do sinal de fluorescência FAM nos controlos positivos (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4):

- O corante de deteção selecionado para a análise dos dados da PCR não cumprem o protocolo.
 - Para a análise dos dados, selecionar o corante de deteção FAM para a PCR analítica de CMV e o corante de deteção VIC/JOE para a PCR do *controlo interno*.
- As definições utilizadas para a análise dos dados em *Options (Extension Phase Data Extraction)* não correspondem às definições de *Data Collection* (para o ABI PRISM 7700 SDS ver **8.6.2.4 Criação do perfil de temperatura**, para o ABI PRISM 7900HT SDS ver **8.6.3.4 Criação do perfil de temperatura**).
 - Analisar o ensaio de PCR com as definições corrigidas e repetir a análise (*Analysis*).
- Programação incorreta do perfil de temperatura do ABI PRISM Sequence Detection System.
 - Comparar o perfil de temperatura com o protocolo (ver **8.6 Programação do ABI PRISM SDS**).
- Configuração incorreta da reação de PCR.
 - Rever os passos com ajuda do esquema de pipetagem (ver **8.5 Preparação da PCR**) e, se for o caso, repetir a PCR.
- As condições de conservação para um ou mais componentes do kit não cumprem as instruções fornecidas em **2**. Prazo de validade de **armazenamento** ou do kit *artus* CMV TM PCR expirou.
 - Verificar as condições de conservação e a data de validade (ver etiqueta do kit) dos reagentes e usar um novo kit, caso seja necessário.

Sinal do controlo interno de uma amostra de plasma negativa adicionada na purificação (kit QIAamp DSP Virus) enfraquecido ou inexistente (sinal de fluorescência VIC/JOE, desvio maior que $Ct = 27 \pm 3$; limite: ABI PRISM 7000: 0,1, ABI PRISM 7700 e 7900HT SDS: 0,2) e ausência simultânea de um sinal de fluorescência FAM da PCR específica do CMV:

- As condições de PCR não cumprem os requisitos do protocolo.
 - Verificar as condições da PCR (ver acima) e repetir a PCR com as definições corrigidas, caso seja necessário.
- A PCR foi inibida.
 - Assegurar que é utilizado o procedimento de isolamento recomendado (ver **8.2 Isolamento de ADN**) e cumprir estritamente as instruções do fabricante.
 - Certificar-se de que é efetuado o passo recomendado de centrifugação adicional para completa eliminação de resíduos de etanol antes da eluição no isolamento de ADN (ver **8.2 Isolamento de ADN**).
- Ocorreram perdas de ADN durante a extração.
 - Se o *controlo interno* tiver sido adicionado à extração, a ausência de um sinal do *controlo interno* pode indicar a perda de ADN durante a extração. Certificar-se de que é utilizado um procedimento de isolamento recomendado (ver **8.2 Isolamento de ADN**) e cumprir estritamente as instruções do fabricante.
- As condições de conservação para um ou mais componentes do kit não cumprem as instruções fornecidas em 2. .Prazo de validade de **rmazenamento** ou do kit *artus* CMV TM PCR expirou.
 - Verificar as condições de conservação e a data de validade (ver etiqueta do kit) dos reagentes e usar um novo kit, caso seja necessário.

Sinal de fluorescência FAM da PCR analítica com controlos negativos:

- Ocorreu uma contaminação durante a preparação da PCR.
 - Repetir a PCR com novos reagentes nos replicados.
 - Se possível, fechar os tubos de PCR diretamente após adicionar a amostra a ser testada.
 - Pipetar o controlo positivo sempre no fim.
 - Assegurar que o espaço de trabalho e os instrumentos são descontaminados regularmente.
- Ocorreu uma contaminação durante a extração.
 - Repetir a extração e a PCR da amostra a ser testada usando novos reagentes.
 - Assegurar que o espaço de trabalho e os instrumentos são descontaminados regularmente.

Em caso de dúvidas ou problemas, contactar a nossa assistência técnica.

11. Especificações

11.1 Sensibilidade analítica

Para o kit *artus* CMV TM PCR, foi determinado tanto o limite de deteção analítica quanto o limite de deteção analítica relativa à purificação (limite de sensibilidade). O limite de deteção analítica relativa à purificação é determinado através de amostras clínicas positivas para o CMV e de acordo com o método de extração utilizado. O limite de deteção analítica, por sua vez, é determinado sem amostras clínicas e independente do método de extração selecionado através de ADN de CMV com uma determinada concentração.

Para determinar a **sensibilidade analítica** do kit *artus* CMV TM PCR, foi criada uma série de diluições de ADN genómico de CMV de 10 ao valor nominal de 0,00316 cópias de CMV/µl e analisadas nos *ABI PRISM 7000*, *7700* e *7900HT Sequence Detection Systems* em conjunto com o kit *artus* CMV TM PCR. As análises foram efetuadas para cada instrumento em três dias diferentes, contendo cada uma delas oito replicações. Os resultados foram apurados com a ajuda de uma análise de probit.

Limite de deteção (p = 0,05)	
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i>	0,20 cópias/µl
<i>ABI PRISM 7700 SDS</i>	0,20 cópias/µl
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>	0,17 cópias/µl

Isto significa que existe uma probabilidade de 95% de serem detetadas 0,20 cópias/ μ l (*ABI PRISM 7000 SDS*), 0,20 cópias/ μ l (*ABI PRISM 7700 SDS*) e 0,17 cópias/ μ l (*ABI PRISM 7900HT SDS*) respetivamente.

A **sensibilidade analítica relativa à purificação (kit QIAamp DSP Virus)** do kit *artus* CMV TM PCR foi determinada com uma série de diluições de material do CMV de 1000 ao valor nominal de 0,316 cópias de CMV/ml em amostras clínicas de plasma. Estas foram sujeitas a extração de ADN utilizando o kit QIAamp DSP Virus (volume de extração: 0,5 ml, volume de eluição: 70 μ l). Cada uma das oito diluições foi analisada com o kit *artus* CMV TM PCR no *ABI PRISM 7000*, *7700* e *7900HT SDS* em três dias diferentes em oito replicações. Os resultados foram determinados por uma análise de probit e são apresentados na tabela que se segue:

Limite de deteção ($p = 0,05$) relativamente à purificação	
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i>	64,2 cópias/ml
<i>ABI PRISM 7700 SDS</i>	100,5 cópias/ml
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>	53,5 cópias/ml

A Fig. 29 representa uma ilustração gráfica do *ABI PRISM 7000 SDS*. O limite de deteção analítica relativa à purificação do kit *artus* CMV TM PCR é 64,2 cópias/ml ($p = 0,05$). Isto significa que existe uma probabilidade de 95% de o limite de 64,2 cópias/ml ser detetado.

Análise de probit: Citomegalovírus (*ABI PRISM 7000 SDS*)

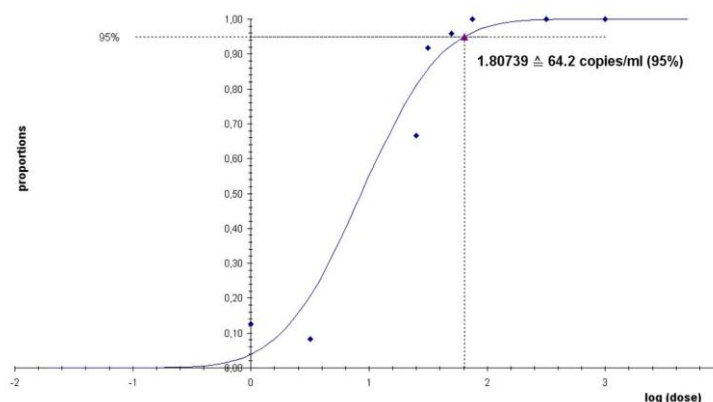


Fig. 29: Sensibilidade analítica relativa à purificação (kit QIAamp DSP Virus) do kit *artus* CMV TM PCR (*ABI PRISM 7000 SDS*).

11.2 Especificidade

A especificidade do kit *artus* CMV TM PCR é, em primeiro lugar, garantida através da seleção dos primers e das sondas, assim como da seleção de condições de reação otimizadas. Os primers e as sondas foram verificados em termos de possível homologia com todas as sequências publicadas nos bancos de genes, por análise comparativa de sequências. A detetabilidade de todas as estripes relevantes foi assim assegurada.

Além disso, a especificidade foi validada com 100 amostras diferentes de plasma negativo para CMV. Estas não geraram quaisquer sinais com os primers e sondas específicos do CMV que estão incluídos no *CMV TM Master*.

Para determinar a especificidade do kit *artus* CMV TM PCR, foi testado o grupo de controlo indicado na tabela que se segue (ver Tabela 1) quanto a reações cruzadas. Nenhum dos agentes patogénicos testados era reativo. Em infeções mistas, não ocorrem reações cruzadas.

Tabela 1: Testes de especificidade do kit com agentes patogénicos com potencial de reação cruzada.

Grupo de controlo	CMV (FAM)	Controlo interno (VIC)
Vírus do herpes humano 1 (vírus Herpes-simplex 1)	-	+
Vírus herpes humano 2 (vírus Herpes simplex)	-	+

2)		
Vírus do herpes humano 3 (vírus Varicela-zóster)	-	+
Vírus do herpes humano 4 (vírus Epstein-Barr)	-	+
Vírus do herpes humano 6A	-	+
Vírus do herpes humano 6B	-	+
Vírus do herpes humano 7	-	+
Vírus do herpes humano 8 (vírus do herpes associado ao sarcoma de Kaposi)	-	+
Vírus da Hepatite A	-	+
Vírus da hepatite B	-	+
Vírus da Hepatite C	-	+
Vírus da Imunodeficiência Humana 1	-	+
Vírus da leucemia de células T humano tipo 1	-	+
Vírus da leucemia de células T humano tipo 2	-	+
Vírus da Febre do Vale do Nilo	-	+
Enterovírus	-	+
Parvovírus B19	-	+

11.3 Precisão

Os dados de precisão do kit *artus* CMV TM PCR foram recolhidos através do *ABI PRISM 7000 SDS* e permitem apurar a variância total do ensaio. A variância total consiste na **variabilidade intra-ensaio** (variabilidade de múltiplos resultados de amostras da mesma concentração dentro de um ensaio), na **variabilidade entre ensaios** (variabilidade de resultados múltiplos do ensaio gerados nos diversos instrumentos do mesmo tipo, por diferentes operadores num laboratório) e a **variabilidade entre lotes** (variabilidade de resultados múltiplos do ensaio utilizando diversos lotes). Os dados obtidos foram utilizados para determinar o desvio-padrão, a variância e o coeficiente de variação para o agente patogénico específico e a PCR de *controlo interno*.

Os dados de precisão do kit *artus* CMV TM PCR foram recolhidos utilizando o *padrão de quantificação* com a menor concentração (QS 4; 10 cópias/μl). O teste foi realizado com oito replicações. Os dados de precisão foram calculados com base nos valores de Ct das curvas de amplificação (CT: *ciclo limite*, ver Tabela 2). Além disso, foram determinados dados de precisão para resultados quantitativos em cópias/μl, utilizando os valores de Ct correspondentes (ver Tabela 3). De acordo com estes resultados, o intervalo estatístico de uma amostra qualquer com a concentração indicada é de 1,06% (Ct) ou 12,93% (conc.), para a deteção do *controlo interno* 1,14% (Ct). Estes valores baseiam-se na totalidade de todos os valores individuais das variabilidades apuradas.

Tabela 2: Dados de precisão com base nos valores Ct.

	Desvio-padrão	Variância	Coefficiente de variação [%]
Variabilidade intra-ensaio: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,10	0,01	0,33
Variabilidade intra-ensaio: <i>Controlo interno</i>	0,12	0,01	0,50
Variabilidade entre ensaios: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,21	0,04	0,67
Variabilidade entre ensaios: <i>Controlo interno</i>	0,30	0,09	1,23
Variabilidade entre lotes: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,32	0,10	1,01
Variabilidade entre lotes: <i>Controlo interno</i>	0,26	0,07	1,05
Variância total: <i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,33	0,11	1,06
Variância total: <i>Controlo interno</i>	0,28	0,08	1,14

Tabela 3: Dados de precisão com base nos valores quantitativos (em cópias/μl).

	Desvio-padrão	Variância	Coefficiente de variação [%]
Variabilidade intra-ensaio: CMV LC/RG/TM QS 4	0,72	0,52	7,20
Variabilidade entre ensaios: CMV LC/RG/TM QS 4	1,25	1,57	12,45
Variabilidade entre lotes: CMV LC/RG/TM QS 4	1,53	2,33	15,10
Variância total: CMV LC/RG/TM QS 4	1,30	1,70	12,93

11.4 Robustez

A verificação da robustez permite determinar a taxa total de erro do kit *artus* CMV TM PCR. 100 amostras de plasma negativas foram contaminadas com ADN de CMV numa concentração final de 170 cópias/ml (aproximadamente três vezes a concentração dos limites de sensibilidade analíticos). Após a extração utilizando o kit QIAamp DSP Virus (ver **8.2 Isolamento de ADN**), estas amostras foram analisadas com o kit *artus* CMV TM PCR. A taxa de erro foi de 0% para a totalidade das amostras de CMV. A robustez do *controlo interno* foi verificada adicionalmente através da purificação e da análise de 100 amostras de plasma negativas para o CMV. Deste modo, a robustez do kit *artus* CMV TM PCR é de $\geq 99\%$.

11.5 Reprodutibilidade

Os dados de reprodutibilidade permitem uma avaliação regular do desempenho do kit *artus* CMV TM PCR, bem como uma comparação de eficiência com outros produtos. Estes dados foram obtidos pela participação nos programas de competência estabelecidos.

11.6 Avaliação diagnóstica

O kit *artus* CMV TM PCR foi avaliado num estudo. Ao comparar o kit *artus* CMV TM PCR com o teste COBAS® AMPLICOR® CMV MONITOR®, 154 amostras clínicas de plasma com EDTA foram analisadas retro e prospectivamente. Todas as amostras foram previamente analisadas positivas ou negativas utilizando o COBAS AMPLICOR CMV MONITOR para diagnóstico de rotina.

As amostras para testar o kit *artus* CMV TM PCR foram isoladas através da adição do *controlo interno* do kit *artus* CMV TM PCR utilizando o kit QIAamp DSP Virus e, posteriormente, analisadas com o *ABI PRISM 7000 SDS*. As amostras para o teste COBAS AMPLICOR CMV MONITOR foram isoladas e analisadas de acordo com as instruções do fabricante fornecidas no folheto informativo da embalagem.

Todas as 11 amostras que se revelaram positivas com o teste COBAS AMPLICOR CMV MONITOR também se revelaram positivas com o kit *artus* CMV TM PCR. Todas as 125 amostras que se revelaram negativas com o teste COBAS AMPLICOR CMV MONITOR também se revelaram negativas com o kit *artus* CMV TM PCR. Obtiveram-se 18 resultados discordantes. Os resultados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados do estudo de validação comparativo.

	TESTE COBAS AMPLICOR CMV MONITOR			
		+	-	Total
Kit <i>artus</i> CMV TM PCR	+	11	18	29
	-	0	125	125

Se os resultados obtidos com o teste COBAS AMPLICOR CMV MONITOR forem considerados como referência, a sensibilidade de diagnóstico de todas as amostras do kit *artus* CMV TM PCR é de 100%, sendo a especificidade de diagnóstico de 87,4%.

Uma posterior análise das 18 amostras discordantes confirmaram os resultados dos kits *artus* PCR. Assim, pode supor-se que a discrepância se baseia numa maior sensibilidade do kit *artus* CMV TM PCR.

12. Limitações da utilização do produto

- Todos os reagentes devem ser utilizados exclusivamente para o diagnóstico *in vitro*.
- O produto deve apenas ser utilizado por pessoal com formação específica em procedimentos de diagnóstico *in vitro* e devidamente instruído para o efeito.
- Para resultados de PCR ótimos, é necessário que as instruções do manual do utilizador sejam rigorosamente observadas.
- Atenção aos prazos de validade impressos na caixa e nos rótulos de todos os componentes. Não utilizar componentes cujo prazo de validade tenha expirado.
- Embora rara, a ocorrência de mutações nas regiões altamente conservadas do genoma viral cobertas pelos iniciadores (primers) e/ou sonda do kit pode resultar em sub-quantificação ou falha em detetar a presença do vírus. A validade e o desempenho do ensaio são revistos regularmente.

13. Informações de segurança

Ao trabalhar com produtos químicos, usar sempre equipamento de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (SDS) adequadas. Estas estão disponíveis online no formato PDF, prático e compacto, no endereço www.qiagen.com/safety onde é possível encontrar, visualizar e imprimir as fichas de dados de segurança para cada kit QIAGEN® e respetivos componentes.

Eliminar as amostras e os resíduos do ensaio de acordo com os regulamentos de segurança locais.















14. Controlo de qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade Total da QIAGEN, todos os lotes do kit *artus* CMV TM PCR são testados face a especificações predeterminadas, para garantir uma qualidade constante do produto.

15. Referências

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.

16. Explicação dos símbolos

	Prazo de validade
	Código de lote
	Fabricante
	Número de catálogo
	Número do material
	Manual
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Componentes
	Contém
	Número
	Número do item de comércio mundial
	Contém o suficiente para <N> testes
	Limites de temperatura
	Consultar as instruções de utilização
QS	<i>Padrão de quantificação</i>
IC	<i>Controlo interno</i>
Mg-Sol	<i>Solução de magnésio</i>

Kit artus CMV TM PCR

Marcas comerciais e renúncia de responsabilidade

QIAGEN®, QIAamp®, artus® (QIAGEN Group); ABI PRISM® (Applied Biosystems); AMPLICOR®, COBAS®, MONITOR® (Roche Diagnostics GmbH); FAM™, GeneAmp®, JOE™, MicroAmp®, ROX™, VIC® (Life Technologies).

A aquisição deste produto permite ao comprador o seu uso para efetuar serviços de diagnóstico em processos de diagnóstico humano in vitro. Não é aqui concedida patente geral ou outra licença de qualquer tipo além deste direito de utilização específico a partir da compra.

Para obter informações de licenciamento atualizadas e renúncia de responsabilidades específicas do produto, consultar o manual do utilizador ou o manual de instruções do kit QIAGEN respetivo. Os manuais do kit QIAGEN e do utilizador estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser pedidos à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Acordo de licença limitada

A utilização deste produto implica a concordância por parte de qualquer comprador ou utilizador do kit *artus* CMV TM PCR com os seguintes termos:

1. O kit *artus* CMV TM PCR só pode ser usado de acordo com o *Manual do Kit artus CMV TM PCR* e apenas para utilização com os componentes contidos no kit. A QIAGEN não concede qualquer licença ao abrigo de sua propriedade intelectual para usar ou incorporar os componentes englobados neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, exceto conforme descrito no *Manual do Kit artus CMV TM PCR* e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com.
2. À exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este kit e os seus componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, renovados ou ser objeto de revenda.
4. A QIAGEN recusa especificamente qualquer outra licença, expressa ou implícita, à exceção das expressamente declaradas.
5. O comprador e utilizador do kit concorda em não tomar nem permitir que qualquer outro tome medidas que possam conduzir a ou facilitar qualquer dos atos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições deste Acordo de Licença Limitada em qualquer Tribunal e irá recuperar todos os seus custos legais e de investigação, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir este Acordo de Licença Limitada ou qualquer dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, visite www.qiagen.com.

© 2007-2014 QIAGEN, todos os direitos reservados.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066
Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11
Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556
Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779
Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)
China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325
Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942
Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413
France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928
Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400
Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425
Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061
Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980
Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300
Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145
Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067
Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436
The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602
Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712
Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368
Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050
Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328
Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12
UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999
USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

1046905PT 148051759

