

# artus<sup>®</sup> EBV LC PCR Kit

## Manual de Instruções

 24 (Catálogo Nr. 4501063)

 96 (Catálogo Nr. 4501065)

Diagnóstico in vitro quantitativo

Para utilização com o equipamento LightCycler<sup>®</sup>

Versão 1



4501063, 4501065



1046892PT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R2

**MAT**

1046892PT



## **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 avançados produtos e serviços de elevada qualidade da nossa empresa garantem o 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 permitir-lhe-á alcançar o sucesso, bem como resultados notáveis. Para mais informações, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Índice

<b>1. Conteúdo .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Conservação.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Materiais e aparelhos necessários adicionalmente.....</b>	<b>6</b>
<b>4. Medidas gerais de segurança .....</b>	<b>6</b>
<b>5. Informações acerca do agente patogénico .....</b>	<b>6</b>
<b>6. Princípio da PCR em Tempo Real (Real-Time PCR) .....</b>	<b>7</b>
<b>7. Descrição do produto.....</b>	<b>7</b>
<b>8. Protocolo .....</b>	<b>8</b>
8.1 Isolamento de ADN .....	8
8.2 Controlo interno .....	11
8.3 Quantificação.....	12
8.4 Preparação da PCR.....	14
8.5 Programação do equipamento <i>LightCycler</i> .....	18
<b>9. Análise dos dados .....</b>	<b>21</b>
<b>10. Resolução de problemas.....</b>	<b>24</b>
<b>11. Especificações .....</b>	<b>26</b>
11.1 Sensibilidade analítica .....	26
11.2 Especificidade.....	27
11.3 Precisão .....	28
11.4 Reprodutibilidade .....	30
11.5 Avaliação diagnóstica .....	30
<b>12. Indicações especiais sobre a utilização do produto .....</b>	<b>30</b>

13. Avisos e precauções .....	30
14. Controlo de qualidade .....	31
15. Referência bibliográfica .....	31
16. Descrição dos Símbolos.....	32

## artus EBV LC PCR Kit

Para utilização com o equipamento *LightCycler*.

### 1. Conteúdo

	Legenda e conteúdo	NºArt. 4501063 24 reacções	NºArt. 4501065 96 reacções
<b>Azul</b>	EBV LC Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
<b>Vermelho</b>	EBV LC/RG/TM QS 1 <sup>†</sup> 5 x 10 <sup>4</sup> cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
<b>Vermelho</b>	EBV LC/RG/TM QS 2 <sup>†</sup> 5 x 10 <sup>3</sup> cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
<b>Vermelho</b>	EBV LC/RG/TM QS 3 <sup>†</sup> 5 x 10 <sup>2</sup> cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
<b>Vermelho</b>	EBV LC/RG/TM QS 4 <sup>†</sup> 5 x 10 <sup>1</sup> cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
<b>Verde</b>	EBV LC IC <sup>†</sup>	1 x 1.000 μl	2 x 1.000 μl
<b>Branco</b>	Water (PCR grade)	1 x 1.000 μl	1 x 1.000 μl

<sup>†</sup> QS = Padrão de  
quantificação IC =  
Controlo interno

### 2. Conservação

Os componentes do *artus EBV LC PCR Kit* são conservados entre -30 e -15 °C e devem ser utilizados antes do fim da data de validade indicada no rótulo. A repetida descongelação e congelação (> 2 x) deve ser evitada, pois, devido a isto, a sensibilidade pode ser reduzida. No caso de utilização irregular, os reagentes devem, por isso, ser divididos 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 aparelhos necessários adicionalmente

- Luvas de laboratório isentas de pó
- Kit de isolamento de ADN (ver capítulo 8.1 Isolamento de ADN)
- Pipetas (reguláveis)
- Pontas de pipetas estéreis com filtros
- Misturador vórtex
- Centrífuga de bancada com rotor para tubos de reacção de 2 ml
- *Color Compensation Set* (Roche Diagnostics, Cat. Nº: 2 158 850) para a criação de um arquivo *Crosstalk Color Compensation*
- Capilares *LightCycler* (20 µl)
- *LightCycler* Cooling Block
- Equipamento *LightCycler*
- *LightCycler* Capping Tool

### 4. Medidas gerais de segurança

O utilizador deve ter sempre em atenção o seguinte:

- Utilizar pontas de pipetas estéreis com filtros.
- Armazenar, purificar e acrescentar à reacção os materiais positivos (amostras, controlos, produtos de amplificação) separados fisicamente dos restantes reagentes.
- Antes de iniciar o teste, descongelar totalmente todos os componentes à temperatura ambiente.
- Em seguida, misturar completamente e centrifugar brevemente os componentes.
- Trabalhar rapidamente em gelo ou no *LightCycler* Cooling Block.

### 5. Informações acerca do agente patogénico

A transmissão do vírus Epstein-Barr (VEB) ocorre por via oral, na maioria das vezes através de saliva contaminada. A infecção por VEB evolui geralmente, sobretudo na infância, de forma assintomática. Um sinal clínico de uma

infecção aguda é a mononucleose infecciosa com febre, cansaço e angina, assim como inchaço dos nódulos linfáticos e do baço. Em alguns doentes, as queixas podem ser crónicas. Formas graves de evolução da infecção por EBV são observadas especialmente em doentes com o sistema imunológico fragilizado e pessoas com deficiências nas células T.

## 6. Princípio da PCR em Tempo Real (Real-Time PCR)

No diagnóstico por meio de reacção de polimerização em cadeia (PCR), são amplificadas regiões específicas do genoma do agente patogénico. A detecção do material amplificado efectua-se com a ajuda de corantes fluorescentes na PCR em Tempo Real. Estes estão acoplados geralmente a sondas oligonucleotídicas que se ligam especificamente ao material amplificado pela PCR. A detecção das intensidades de fluorescência no decorrer da PCR em Tempo Real possibilita a detecção e a quantificação dos produtos sem ter que se voltar a abrir os tubos das amostras depois de concluída a PCR (Mackay, 2004).

## 7. Descrição do produto

O *artus* EBV LC PCR Kit é um sistema pronto a utilizar para a detecção de ADN do VEB através da reacção de polimerização em cadeia (PCR) no equipamento *LightCycler*. A *EBV LC Master* contém os reagentes e enzimas para a amplificação específica de uma região de 97 pb do genoma do EBV, assim como para a detecção directa do material amplificado no canal de fluorescência F2 do equipamento *LightCycler*. Paralelamente, o *artus* EBV LC PCR Kit contém um segundo sistema heterólogo de amplificação para a comprovação de uma possível inibição da PCR. Este é detectado como um *Controlo interno (IC)* no canal de fluorescência F3. O limite de detecção da PCR analítica do VEB não é reduzido (ver capítulo 11.1 **Sensibilidade analítica**). São fornecidos controlos positivos externos (*EBV LC/RG/TM QS 1 -*

4), que permitem a determinação da carga de agente patogénico (ver capítulo 8.3 Quantificação).

**Atenção:** O perfil de temperatura para a detecção do ADN do EBV com ajuda do *artus* EBV LC PCR Kit corresponde aos do *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit, do *artus* VZV LC PCR Kit e do *artus* CMV LC PCR Kit. Por esta razão, as reacções da PCR para esses sistemas *artus* podem ser realizadas e analisadas em um só ensaio. Tenha em atenção as instruções especiais para a análise nos capítulos 8.3 Quantificação e em 9. Análise dos Dados.

## 8. Protocolo

### 8.1 Isolamento de ADN

Os kits de isolamento de ADN podem ser fornecidos por diversos fabricantes. Em função do protocolo do fabricante seleccionado, recolha o volume de amostra indicado para a purificação e efectue o isolamento de ADN conforme as instruções do fabricante. Os seguintes kits de isolamento são recomendados:

Material de Amostra	Kit de Purificação	Número de Catálogo	Fabricante	Carrier-ARN
Soro, plasma, LCR (líquido céfalo-raquidiano)	QIAamp <sup>®</sup> DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	não contém
	QIAamp UltraSens <sup>®</sup> Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	contém
Células sanguíneas	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	51 104	QIAGEN	não contém
Plasma	EZ1 <sup>®</sup> DSP Virus Kit (48)*	62 724	QIAGEN	contém

\*Para ser usado em combinação com o BioRobot<sup>®</sup> EZ1 DSP Workstation (Cat. No. 9001360) e com o EZ1 DSP Virus Card (Cat. No. 9017707).



**Nota importante para o uso do QIAamp UltraSens Virus Kit e do QIAamp DNA Mini Kit:**

- A adição de **Carrier-ARN** é de grande importância para a eficiência e, com isso, para o rendimento do ADN/ARN. Caso o kit de isolamento utilizado não contenha Carrier-ARN, recomenda-se, imprescindivelmente, a adição de Carrier-ARN (RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, Cat. No. 27-4110-01) para a extração dos ácidos nucleicos de líquidos biológicos sem células ou de materiais com pequena quantidade de ADN/ARN (p. ex. líquido cefaloraquidiano). Por favor, siga as seguintes instruções:
  - a) Para isso, ressuspenda o Carrier-ARN liofilizado em tampão de eluição (não em tampão de lise) do kit de isolamento (p. ex. tampão AE do QIAamp DNA Mini Kit/QIAamp DNA Blood Mini Kit) e crie uma diluição com uma concentração de  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . De acordo com a quantidade exigida, divida a solução de Carrier-ARN em alíquotas que devem ser armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Evite a repetida descongelação ( $> 2 \times$ ) de uma alíquota de Carrier-ARN.
  - b) Por purificação, deve ser adicionado  $1 \mu\text{g}$  de Carrier-ARN por  $100 \mu\text{l}$  de tampão de lise. Se o protocolo de extração prevê, por exemplo,  $200 \mu\text{l}$  de tampão de lise por amostra purificada, então adicione  $2 \mu\text{l}$  do Carrier-ARN ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) directamente ao tampão de lise. Antes de iniciar qualquer purificação, deve ser feita uma mistura nova de tampão de lise e Carrier-ARN (e, se for o caso *Controlo interno*, ver capítulo **8.2 Controlo interno**) de acordo com o seguinte esquema de pipetagem.

Número de amostras	1	12
Tampão de lise	p. ex. $200 \mu\text{l}$	p. ex. $2.400 \mu\text{l}$
Carrier-ARN ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	$2 \mu\text{l}$	$24 \mu\text{l}$
<b>Volume Total</b>	<b><math>202 \mu\text{l}</math></b>	<b><math>2.424 \mu\text{l}</math></b>
<b>Volume para a purificação</b>	<b><math>200 \mu\text{l}</math></b>	<b>cada <math>200 \mu\text{l}</math></b>

- c) Utilize a mistura de tampão de lise e Carrier-ARN para a purificação logo após a preparação. Não é possível conservar a mistura.
- A adição de **Carrier-ARN** é de grande importância para a eficiência e, com isso, para o rendimento do ADN/ARN. Para obter uma estabilidade maior do Carrier-ARN QIAamp UltraSens Virus Kit fornecido, recomendamos o procedimento a seguir, diferente do indicado nas instruções do kit de isolamento:
    - Antes da primeira utilização do kit de isolamento, ressuspenda o Carrier-ARN liofilizado em 310  $\mu\text{l}$  de tampão AE ou AVE (tampão de eluição, concentração final 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , não utilizar tampão de lise) e, de acordo com a quantidade exigida, divida esta solução de Carrier-ARN em alíquotas que devem ser armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Evite a repetida descongelação ( $> 2 \times$ ) de uma alíquota de Carrier-ARN.
    - Antes de iniciar qualquer purificação, deve ser feita uma mistura nova de tampão de lise e Carrier-ARN (e, se for o caso *Controlo interno*, ver capítulo **8.2 Controlo interno**) de acordo com o seguinte esquema de pipetagem.

Número de amostras	1	12
Tampão de lise AC	800 $\mu\text{l}$	9.600 $\mu\text{l}$
Carrier-ARN (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	5,6 $\mu\text{l}$	67,2 $\mu\text{l}$
<b>Volume Total</b>	<b>805,6 <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>9.667,2 <math>\mu\text{l}</math></b>
<b>Volume para a purificação</b>	<b>800 <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>cada 800 <math>\mu\text{l}</math></b>

- c) Utilize a mistura de tampão de lise e Carrier-ARN para a purificação logo após a preparação. Não é possível conservar a mistura.
- Através da utilização do **QIAamp UltraSens Virus Kit**, pode-se obter uma concentração da amostra. Se a amostra não se tratar de um soro ou de plasma, então adicione no mínimo 50 % (v/v) de plasma humano negativo à mesma.
  - Os **anticoagulantes** contidos nos tubos de colheita de sangue podem

inibir a PCR, porém são eliminados de um modo eficaz pelos kits de purificação apresentados. É aconselhável que seja evitada a utilização de sangue heparinizado.

- Nas purificações com tampões de lavagem que contêm **etanol**, efectuar sempre, antes da eluição, uma centrifugação adicional (três minutos, 13.000 rpm) para a eliminação dos resíduos de etanol. Isto evita possíveis inibições da PCR.
- O *artus* EBV LC PCR Kit não deverá ser utilizado em conjunto com procedimentos de purificação que utilizam **fenol** como base.

#### **Nota importante para o uso do EZ1 DSP Virus Kit:**

- O uso de **Carrier-ARN** é crítico para a extração eficiente e, conseqüentemente, para o rendimento AND/ARN. Por favor adicione a quantia apropriada de Carrier-ARN para cada extração de acordo com as instruções no manual *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*.

**Importante:** O *Controlo interno* do *artus* EBV LC PCR Kit pode ser adicionado directamente na fase de purificação (ver capítulo **8.2 Controlo interno**).

## **8.2 Controlo interno**

É fornecido um *Controlo interno* (EBV LC IC) com o qual se tem a possibilidade de controlar **não só a purificação do ADN como também uma possível inibição da PCR** (ver Fig. 1). Usando o **EZ1 DSP Virus Kit** para extração, o *Controlo interno* deve ser adicionado de acordo com as instruções no manual *EZ1 DSP Virus Kit Handbook*. Usando o **QIAamp UltraSens VirusKit** ou o **QIAamp DNA Mini Kit**, adicione o *Controlo interno* numa relação de 0,1 µl por 1 µl do volume de eluição na purificação. Se utilizar, por exemplo, o QIAamp DNA Mini Kit e eluir o ADN em 200 µl de tampão AE, então adicione 20 µl de *Controlo interno*. Se, p. ex., eluir em 100 µl, então adicione respectivamente 10 µl. A quantidade de *Controlo interno* acrescentada depende **apenas** do volume de eluição. O *Controlo interno* e eventualmente o Carrier-ARN (ver

capítulo 8.1 Isolamento de ADN) podem ser acrescentados apenas a

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

O *Controlo interno* não pode ser adicionado directamente à amostra. Ter em atenção que a mistura do *Controlo interno* com o tampão de lise/Carrier-ARN deverá ser utilizada logo após ser preparada. A conservação da mistura à temperatura ambiente ou no frigorífico pode em poucas horas inactivar o *Controlo interno* e diminuir a eficiência da purificação. **Não** pipetar o *Controlo interno* e o Carrier-ARN directamente na amostra.

O *Controlo interno* pode ser utilizado, opcionalmente, **exclusivamente para o controlo de uma possível inibição da PCR** (ver Fig. 2). Para isso, adicione, para cada preparação, 0,5  $\mu$ l de *Controlo interno* directamente a 15  $\mu$ l de *EBV LC Master*. Utilize para cada reacção de PCR 15  $\mu$ l da *Master Mix*\* desta forma produzida e adicione, em seguida, 5  $\mu$ l de amostra purificada. Se tiver que preparar um ensaio com várias amostras, então aumente as quantidades necessárias de *EBV LC Master* e de *Controlo interno* proporcionalmente ao número de amostras (ver capítulo 8.4 Preparação da PCR).

O *artus EBV LC PCR Kit* e o *artus CMV LC PCR Kit* possuem um *Controle Interno (IC)* idêntico. O *artus HSV-1/2 LC PCR Kit* e o *artus VZV LC PCR Kit* também possuem um *Controle Interno* idêntico.

### 8.3 Quantificação

Os *Padrões de quantificação* fornecidos (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*) são tratados como uma amostra purificada e utilizados no mesmo volume (5  $\mu$ l). Para criar uma curva padrão no equipamento *LightCycler*, utilize todos os quatro *Padrões de quantificação* fornecidos, defina-os no *Sample Loading Screen* como padrões e introduza as concentrações indicadas (ver *LightCycler Operator's Manual*, Versão 3.5, Chapter B, 2.4. Sample Data Entry). Esta curva padrão pode ser utilizada também para as próximas quantificações se,

durante o ensaio actual, for introduzido no mínimo um padrão de **uma** determinada concentração. Para isso, é necessário importar a curva padrão previamente criada (ver *LightCycler Operator's Manual*, Versão 3.5, Chapter B, 4.2.5. Quantification with an External Standard Curve). Porém, nesta forma de quantificação, tem que ser levado em consideração que, devido à variabilidade entre os ensaios de PCR, podem ocorrer desvios nos resultados. **Caso tenha sido integrado mais do que um sistema Herpes-artus no seu ensaio de PCR, então certifique-se de que cada um seja analisado com o respectivo Padrão de quantificação separadamente.**

**Atenção:** Os Padrões de quantificação são definidos em cópias/ $\mu$ l. Para a conversão dos valores apurados com base na curva padrão em cópias/ml de amostra, deve-se utilizar a seguinte fórmula:

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

Ter em atenção que sempre deverá ser introduzido na fórmula o volume inicial. Isto deve ser considerado quando o volume da amostra for alterado antes da purificação dos ácidos nucleicos (p. ex.: redução através da centrifugação ou aumento através do complemento do volume recomendado para a purificação).

---

\* O aumento de volume causado através da adição do *Controlo interno* é desprezável na preparação da reacção de PCR. A sensibilidade do sistema de detecção não é afectada.

**Importante:** Para a simplificação da avaliação quantitativa de sistemas *artus* no equipamento *LightCycler*, existe em [www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX](http://www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX) um guia (Technical Note for quantitation on the *LightCycler 1.1/1.2/1.5* or *LightCycler 2.0* Instrument).

## 8.4 Preparação da PCR

Certifique-se de que o Cooling Block com o adaptador nele contido (acessório do equipamento *LightCycler*) tenha sido pré-refrigerado a aproximadamente +4°C. Coloque para as reacções planeadas a quantidade necessária de capilares *LightCycler* no adaptador do Cooling Block. Certifique-se de que sejam introduzidos, por ensaio de PCR, no mínimo um *Padrão de quantificação*, assim como um controlo negativo (*Water, PCR grade*). Para a criação de uma curva padrão, por favor utilizar, por ensaio de PCR, todos os *Padrões de quantificação* fornecidos (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*). Todos os reagentes devem ser totalmente descongelados à temperatura ambiente, bem misturados (pipetando para cima e para baixo várias vezes ou misturando brevemente no vórtex) e em seguida centrifugados antes do início do teste.

Se desejar controlar, com o *Controlo interno*, não só a purificação do ADN como também uma possível inibição da PCR, o *Controlo interno* já deverá ter sido introduzido na purificação (ver capítulo 8.2 *Controlo interno*). Neste caso, utilize o seguinte esquema de pipetagem (ver também o esquema reproduzido na Fig. 1):

	Quantidade de Amostras	1	12
1. Preparação da Master Mix	<i>EBV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>EBV LC IC</i>	0 µl	0 µl
	<b>Volume Total</b>	<b>15 µl</b>	<b>180 µl</b>
2. Preparação da Reacção de PCR	Master Mix	15 µl	cada 15 µl
	Amostra	5 µl	cada 5 µl
	<b>Volume Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>cada 20 µl</b>

Se desejar utilizar o *Controlo interno exclusivamente para o controlo de uma inibição da PCR*, então adicione-o directamente à *EBV LC Master*. Neste caso, utilize o seguinte esquema de pipetagem (ver também o esquema reproduzido na Fig. 2):

		Quantidade de Amostras	
		1	12
1. Preparação da Master Mix	<i>EBV LC Master</i>	15 $\mu$ l	180 $\mu$ l
	<i>EBV LC IC</i>	0,5 $\mu$ l	6 $\mu$ l
	<b>Volume Total</b>	<b>15,5 <math>\mu</math>l*</b>	<b>186 <math>\mu</math>l*</b>
2. Preparação da Reacção de PCR	Master Mix	15 $\mu$ l*	cada 15 $\mu$ l*
	Amostra	5 $\mu$ l	cada 5 $\mu$ l
	<b>Volume Total</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>	<b>cada 20 <math>\mu</math>l</b>

Pipete para o reservatório de plástico de cada capilar 15  $\mu$ l da Master Mix. Em seguida, adicione 5  $\mu$ l de eluído do isolamento de ADN. De forma correspondente, devem ser colocados como controlo positivo 5  $\mu$ l de pelo menos um dos *Padrões de quantificação (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4)* e como controlo negativo 5  $\mu$ l de água (*Water, PCR grade*). Tape os capilares. Para deslocar o volume preparado do reservatório de plástico para dentro dos capilares, centrifugue os adaptadores e os capilares nele contidos numa centrífuga de bancada durante dez segundos, no máximo a 400 x g (2.000 rpm).

---

\* O aumento de volume causado através da adição do *Controlo interno* é desprezável na preparação da reacção de PCR. A sensibilidade do sistema de detecção não é afectada.

## Adição do Controlo interno para a purificação

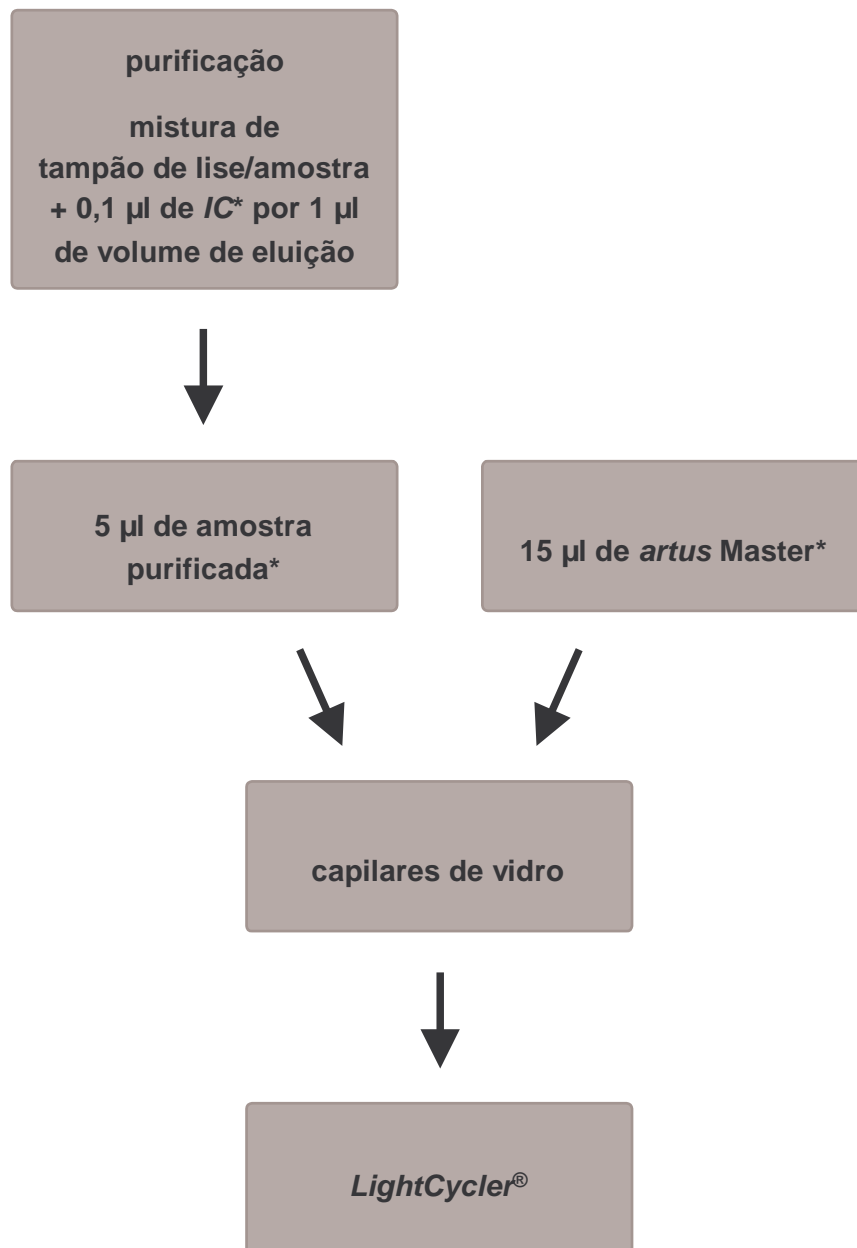


Fig. 1: Fluxo esquemático da operação para o controlo da purificação e da inibição da PCR.

\*

Em cada passo de pipetagem, certifique-se, sempre, de que as soluções a serem utilizadas tenham sido totalmente descongeladas, bem misturadas e brevemente centrifugadas.



## Adição do Controlo interno para o artus Master

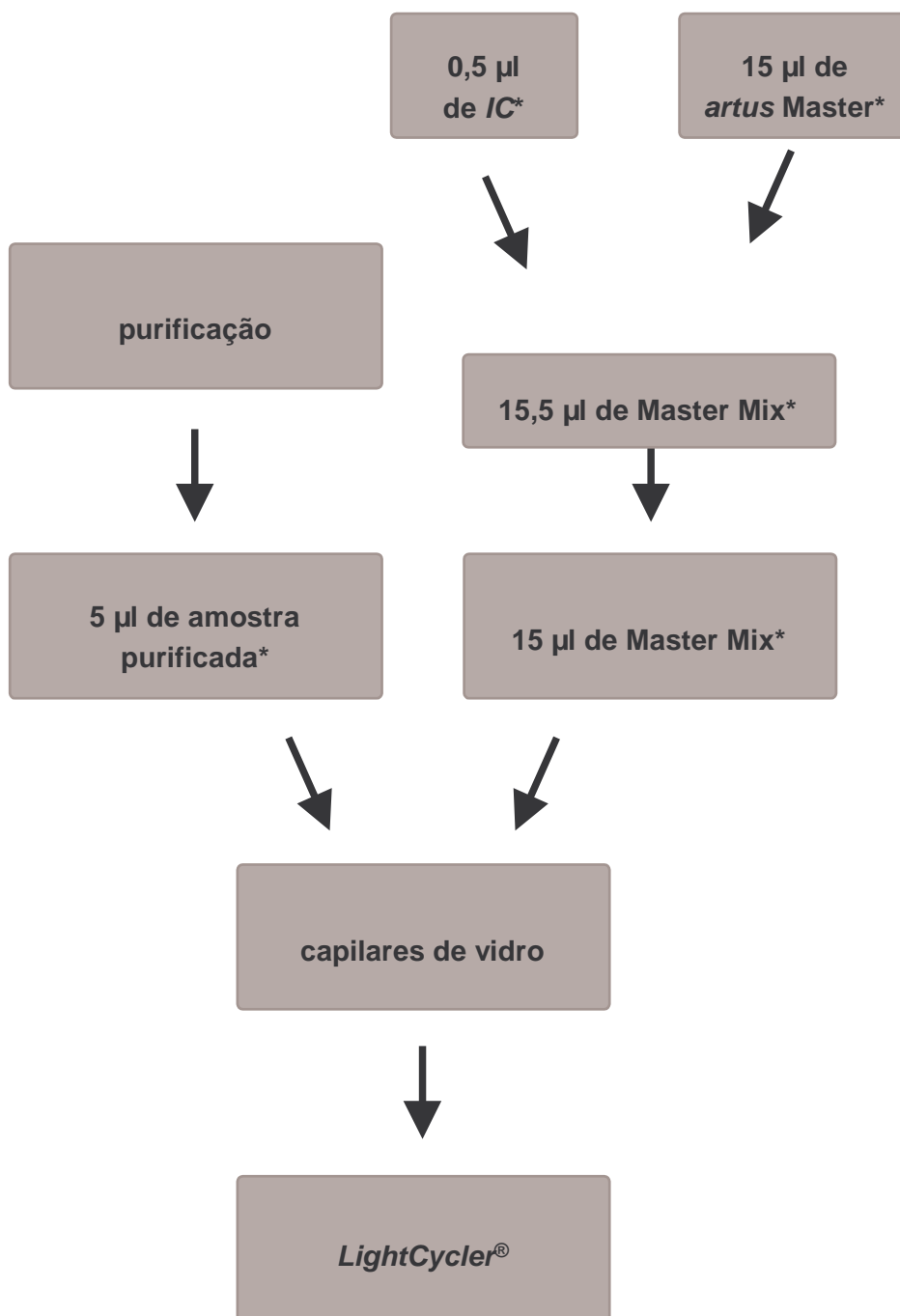


Fig. 2: Fluxo esquemático da operação para o controlo da inibição da PCR.

\*

Em cada passo de pipetagem, certifique-se, sempre, de que as soluções a serem utilizadas tenham sido totalmente descongeladas, bem misturadas e brevemente centrifugadas.

## 8.5 Programação do equipamento *LightCycler*

Para a detecção de ADN do EBV, crie no seu equipamento *LightCycler* um perfil de temperatura com os seguintes cinco passos (conforme as Fig. 3 a 7).

- |    |  |        |
|----|--|--------|
| A. | Activação inicial da enzima Hot Start    | Fig. 3 |
| B. | Passo TouchDown                          | Fig. 4 |
| C. | Amplificação do ADN                      | Fig. 5 |
| D. | Curva de dissociação ( <b>opcional</b> ) | Fig. 6 |
| E. | Refrigeração                             | Fig. 7 |

Tenha especial atenção às configurações *Analysis Mode*, *Cycle Program Data* e *Temperature Targets*. Estas configurações estão destacadas nas figuras com caixa a negro. As indicações sobre a programação do equipamento *LightCycler* encontram-se no *LightCycler Operator's Manual*. A criação do passo D curva de dissociação é **opcional**. Ela só é necessária para a diferenciação entre HSV-1 e HSV-2 na utilização simultânea com o *artus HSV 1/2 LC PCR Kit*.

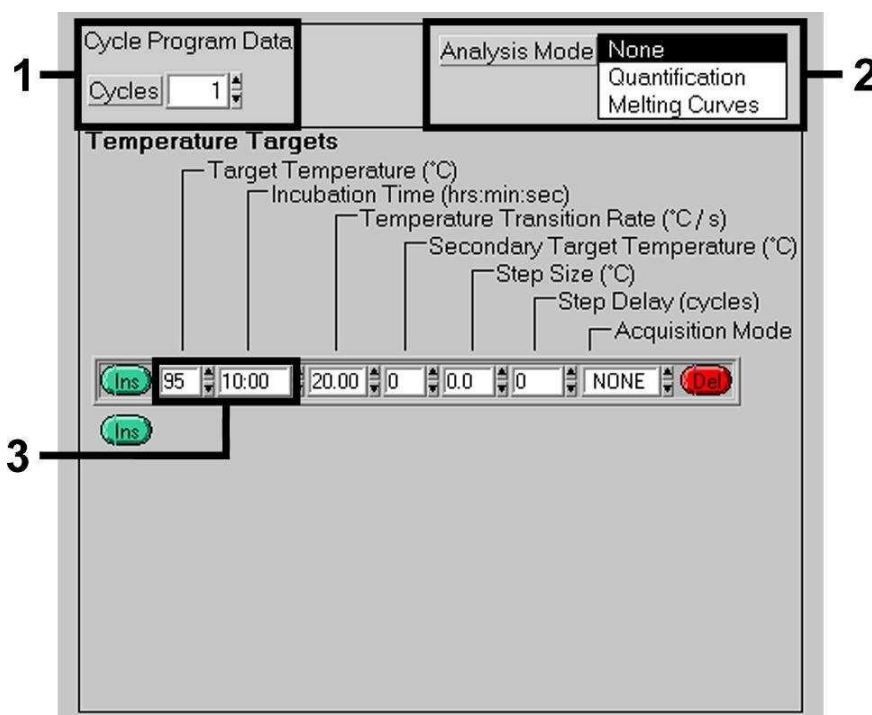


Fig. 3: Activação inicial da enzima Hot Start.

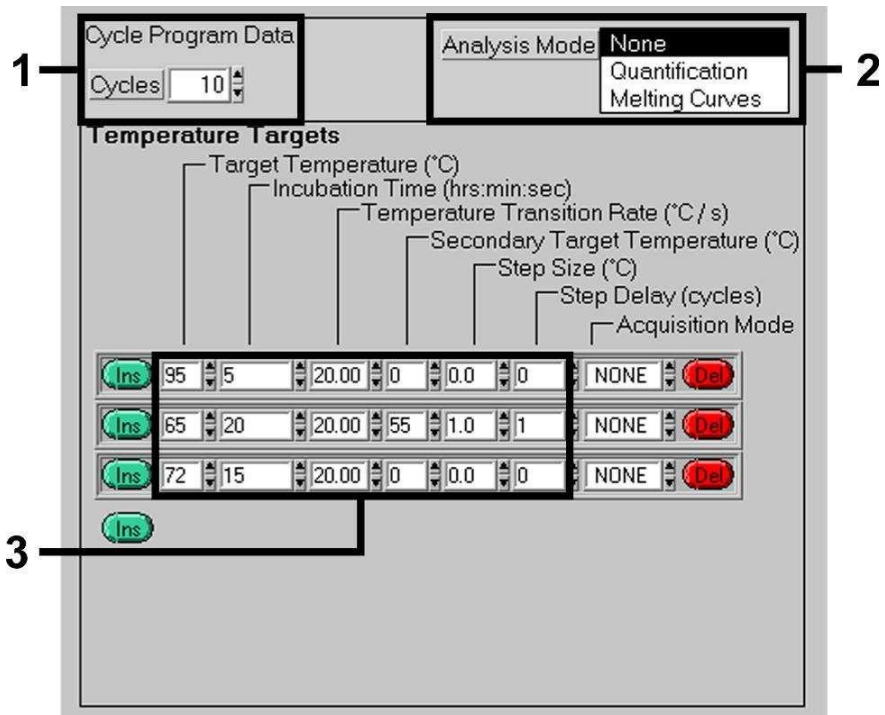


Fig. 4: Passo Touch Down.

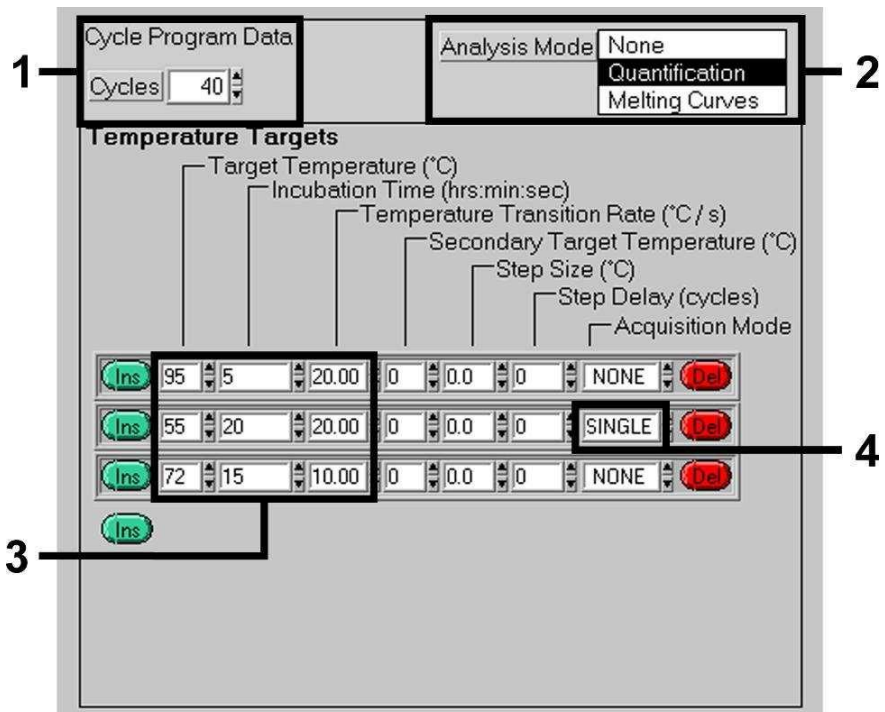


Fig. 5: Amplificação do ADN.

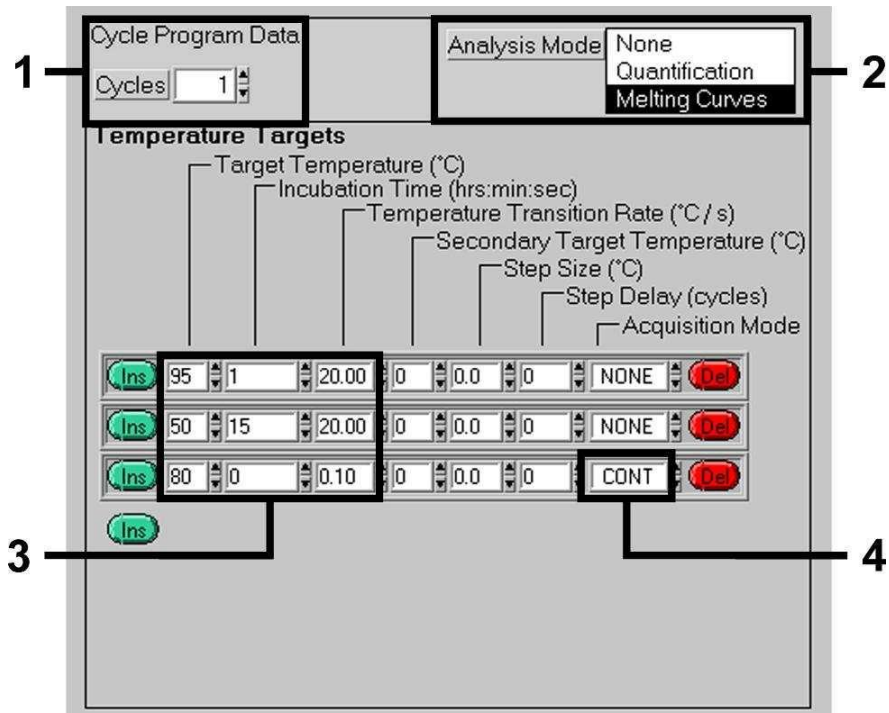


Fig. 6: Curva de dissociação.

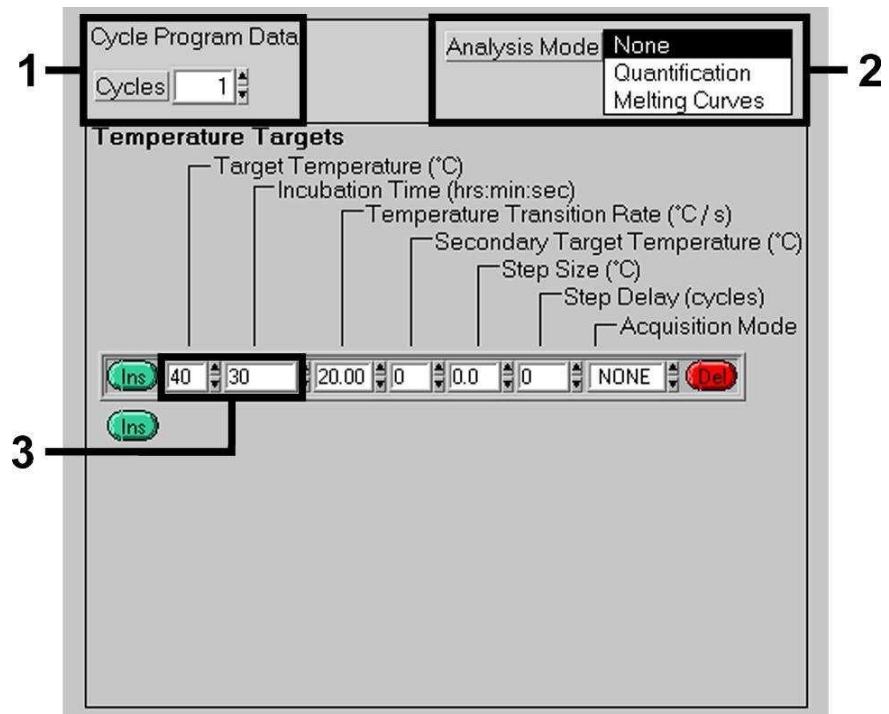


Fig. 7: Refrigeração.

## 9. Análise dos dados

Nas análises multicanal, ocorrem interferências entre os canais de fluorescência. O software do equipamento *LightCycler* contém um arquivo indicado como *Color Compensation File* que compensa estas interferências. Abra este arquivo antes, durante o ensaio de PCR ou logo a seguir, através da activação do botão *Choose CCC File* ou *Select CC Data*. Se não estiver instalado nenhum *Color Compensation File*, crie o arquivo levando em consideração as instruções do *LightCycler Operator's Manual*. Após activação do *Color Compensation File*, aparecem nos canais de fluorescência F1, F2 e F3 sinais separados. Para a análise dos resultados da PCR que foram obtidos com o *artus EBV LC PCR Kit*, seleccione as funções de perspectiva F2/Back-F1 para a PCR analítica do EBV ou, respectivamente, F3/Back-F1 para a PCR do *Controlo interno*. Para a análise de ensaios quantitativos, tenha impreterivelmente em atenção o capítulo **8.3 Quantificação**, assim como a **Technical Note for quantitation on the *LightCycler 1.1/1.2/1.5* or *LightCycler 2.0* Instrument** em [www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX](http://www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX).

Caso tenha sido integrado mais do que um sistema *Herpes-artus* no seu ensaio de PCR, então certifique-se de que as amostras de EBV sejam analisadas separadamente. Para isso, escolha as respectivas posições do rotor para a avaliação.

Os seguintes resultados podem ser obtidos:

1. É detectado um sinal no canal de fluorescência F2/Back-F1.

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

Neste caso, a detecção de um sinal no canal F3/Back-F1 é secundária, pois elevadas concentrações iniciais de ADN do EBV (sinal positivo no canal F2/Back-F1) podem conduzir a uma redução ou até mesmo à ausência do sinal de fluorescência do *Controlo interno* no canal F3/Back-F1 (competição).

2. Não é detectado nenhum sinal no canal de fluorescência F2/Back-F1 e é detectado um sinal no canal F3/Back-F1 (sinal do *Controlo interno*).

**Na amostra, não é detectável nenhum ADN do EBV, por isso ela pode ser considerada negativa.**

No caso de PCR negativa do EBV, o sinal do *Controlo interno* detectado exclui a possibilidade de uma inibição da PCR.

3. Nenhum sinal é detectado, nem no canal F2/Back-F1 e nem no canal F3/Back-F1.

**Não é possível fazer uma avaliação diagnóstica.**

Indicações sobre fontes de erros e suas eliminações estão especificadas no capítulo **10. Resolução de Problemas.**

Exemplos de reacções de PCR positivas e negativas estão reproduzidos nas Fig. 8 e Fig. 9.

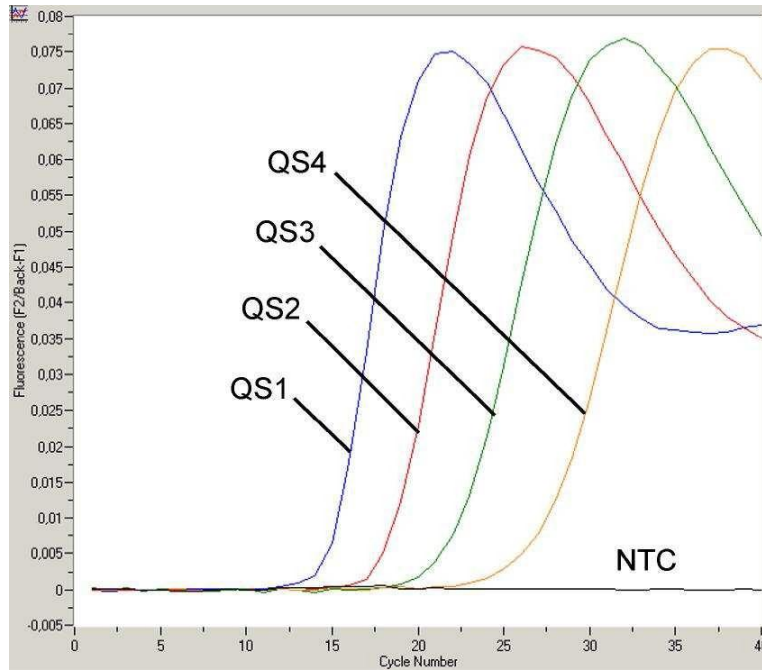


Fig. 8: Detecção dos *Padrões de quantificação* (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4) no canal de fluorescência F2/Back-F1. NTC: non-template control (controlo negativo).

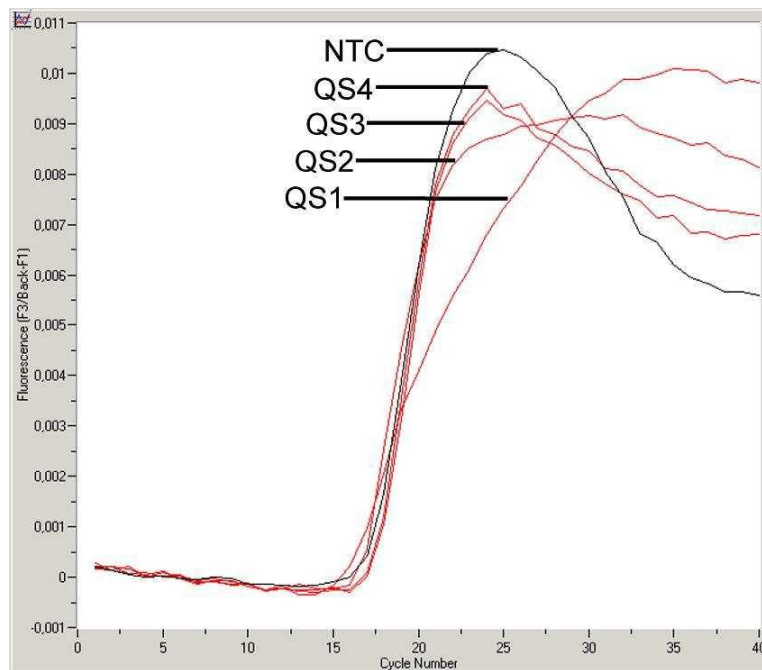


Fig. 9: Detecção do *Controlo interno (IC)* no canal de fluorescência F3/Back-F1 no caso de amplificação simultânea dos *Padrões de quantificação* (EBV LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (controlo negativo).

## 10. Resolução de problemas

Ausência de sinal nos controlos positivos (*EBV LC/RG/TM QS 1 - 4*) no canal de fluorescência F2/Back-F1:

- A selecção do canal de fluorescência na análise dos dados da PCR não corresponde à indicação do protocolo
  - ❖ Seleccione para a análise dos dados o canal de fluorescência F2/Back-F1 para a PCR analítica do EBV e o canal de fluorescência F3/Back-F1 para a PCR do *Controlo interno*.
- A programação do perfil de temperatura do equipamento *LightCycler* estava incorrecta.
  - ❖ Compare o perfil de temperatura com as indicações do protocolo (ver capítulo **8.5 Programação do equipamento *LightCycler***).
- Composição incorrecta da reacção de PCR.
  - ❖ Reveja os passos com ajuda do esquema de pipetagem (ver capítulo **8.4 Preparação da PCR**) e, se for o caso, repita a PCR.
- As condições de conservação para um ou mais componentes do kit não corresponderam às instruções do *artus EBV LC PCR Kit* indicadas no capítulo **2. Conservação** ou a data de validade foi excedida.
  - ❖ Por favor, reveja tanto as condições de conservação como também a data de validade (ver etiqueta no kit) dos reagentes e, se for o caso, utilize um novokit.

Sinal do *Controlo interno* enfraquecido ou até mesmo a ausência do mesmo no canal de fluorescência F3/Back-F1 em caso de simultânea ausência de um sinal no canal F2/Back-F1:

- As condições da PCR não correspondem ao protocolo.
  - ❖ Reveja as condições da PCR (ver acima) e, se for o caso, repita a PCR com as configurações corrigidas.
- A PCR foi inibida.
  - ❖ Certifique-se de que seja utilizado um dos nossos procedimentos de purificação recomendados (ver capítulo **8.1 Isolamento de ADN**) e seja fiel às instruções do fabricante.



- ◆ Certifique-se que seja efectuado o passo recomendado da centrifugação adicional para completa eliminação de resíduos de etanol antes da eluição na purificação do ADN (ver capítulo **8.1 Isolamento de ADN**).
- Ocorreram perdas de ADN por causa da purificação.
  - ◆ Se o *Controlo interno* foi adicionado à purificação, a ausência do sinal do *Controlo interno* pode significar que ocorreram perdas de ADN por causa da purificação. Certifique-se de que seja utilizado um dos nossos procedimentos de purificação recomendados (ver capítulo **8.1 Isolamento de ADN**) e seja fiel às instruções do fabricante.
- As condições de conservação para um ou mais componentes do kit não corresponderam às instruções do *artus EBV LC PCR Kit* indicadas no capítulo **2. Conservação** ou a data de validade foi excedida.
  - ◆ Por favor, reveja tanto as condições de conservação como também a data de validade (ver etiqueta no kit) dos reagentes e, se for o caso, utilize um novokit.

#### **Sinais nos controlos negativos no canal de fluorescência F2/Back-F1 da PCR analítica.**

- Ocorreu uma contaminação durante a preparação da PCR.
  - ◆ Repita a PCR com reagentes ainda não utilizados em réplicas.
  - ◆ Tape cada tubo de PCR, se possível logo após a adição da amostra a ser analisada.
  - ◆ Pipete o controlo positivo sempre no fim.
  - ◆ Certifique-se que a superfície de trabalho e os aparelhos sejam desinfectados frequentemente.
- Ocorreu uma contaminação por causa da purificação.
  - ◆ Repita a purificação e a PCR da amostra a ser analisada com reagentes ainda não utilizados.
  - ◆ Certifique-se que a superfície de trabalho e os aparelhos sejam desinfectados frequentemente.

Se houver dúvidas ou problemas, por favor contacte o nosso suporte técnico.

# 11. Especificações

## 11.1 Sensibilidade analítica

Para determinar a sensibilidade analítica do *artus* EBV LC PCR Kit, foi criada uma série de diluições padrão de 50 a aproximadamente 0,005 equivalentes de cópias do EBV\*/ $\mu\text{l}$  e esta foi analisada com o *artus* EBV LC PCR Kit. As análises foram efectuadas em três dias diferentes, contendo cada uma delas oito determinações. O resultado foi apurado com a ajuda de uma análise de probit. A sua avaliação gráfica está representada na Fig. 10. O limite de detecção do *artus* EBV LC PCR Kit está, desta forma, estabelecido em 5,78 cópias/ $\mu\text{l}$  ( $p = 0,05$ ). Isto significa que existe uma probabilidade de 95 % de serem detectadas 5,78 cópias/ $\mu\text{l}$ .

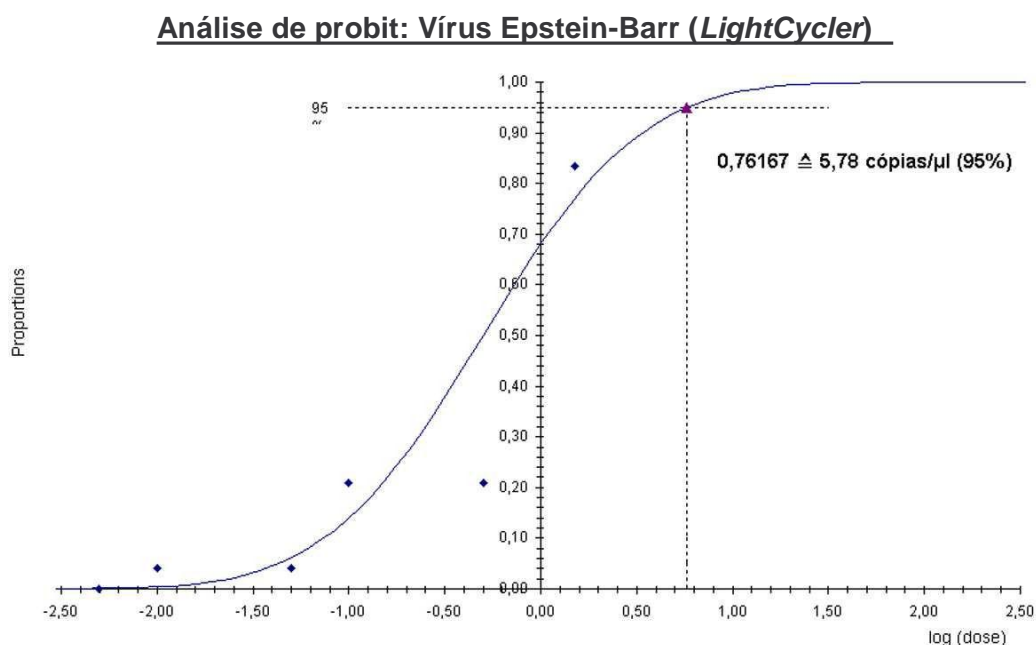


Fig. 10: Sensibilidade analítica do *artus* EBV LC PCRKit.

\* O padrão aqui utilizado é um produto de PCR clonado, cuja concentração foi determinada por espectrofotometria e espectrofluorimetria.

## 11.2 Especificidade

A especificidade do *artus* EBV LC PCR Kit é, em primeiro lugar, garantida através da selecção dos iniciadores (primers) e das sondas, assim como da selecção de condições de reacção optimizadas. Os iniciadores (primers) e as sondas foram verificados mediante uma análise de comparação de sequência quanto a eventuais homologias com todas as sequências publicadas em bancos de genes. Desta forma, foi assegurada a detecção de todos os genótipos relevantes.

Adicionalmente, a validação da especificidade foi realizada com seis diferentes amostras de soro negativas para o EBV que não geraram sinal com os iniciadores (primers) e sondas específicas para o EBV contidos na *EBV LC Master*.

Para a determinação da especificidade do *artus* EBV LC PCR Kit, foi examinado o grupo de controlo citado na Tabela 1 em relação à existência de reacções cruzadas. Nenhum dos agentes patogénicos testados era reactivo.

Tabela 1: Teste da especificidade dos kits com possíveis agentes patogénicos inter-reactivos.

Grupo de Controlo	EBV (F2/Back-F1)	Controlo interno (E3/Back-F1)
Vírus do herpes humano 1 (vírus Herpes-simplex 1)	-	+
Vírus do herpes humano 2 (vírus Herpes-simplex 2)	-	+
Vírus do herpes humano 3 (vírus Varicela-Zoster)	-	+
Vírus do herpes humano 5 (Citomegalovírus)	-	+
Vírus da leucemia humana de células T 1	-	+
Vírus da leucemia humana de células T 2	-	+

## 11.3 Precisão

Os dados de precisão para o *artus* EBV LC PCR Kit possibilitam a averiguação da variância total do sistema de teste. Esta variância total compõe-se da **Variabilidade Intra-Ensaio** (variabilidade de amostras com a mesma concentração em um ensaio), da **Variabilidade Inter-Ensaio** (variabilidade devida à utilização de diversos aparelhos do mesmo tipo, por pessoas diferentes do mesmo laboratório) e da **Variabilidade Inter-Lote** (variabilidade devida à utilização de diferentes lotes). Para este fim, apuram-se o desvio padrão, a variância e o coeficiente de variação tanto para a PCR específica do agente patogénico como também para a de *Controlo interno*.

Estes dados foram apurados para o *artus* EBV LC PCR Kit com base no *Padrão de quantificação* com a menor concentração (QS 4; 50 cópias/ $\mu$ l). As análises foram efectuadas contendo oito fases por determinação. Os resultados do teste de precisão estão representados nos valores do Ct da curva de amplificação (Ct: *threshold cycle*, ver Tabela 2) e nos valores quantitativos em cópias/ $\mu$ l (ver Tabela 3). De acordo com estes resultados, a flutuação estatística de uma amostra qualquer com a concentração determinada é de 1,17 % (Ct), ou seja, 14,54 % (concentração) e para a detecção do *Controlo interno* é de 1,02 % (Ct). Estes valores baseiam-se na totalidade de cada um dos valores apurados nas variabilidades.

Tabela 2: Dados de precisão com base no valor Ct.

	Desvio Padrão	Variância	Coefficiente de variação [%]
Variabilidade Intra-Ensaio: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,20	0,04	0,90
Variabilidade Intra-Ensaio: <i>Controlo interno</i>	0,04	0,00	0,28
Variabilidade Intra-Ensaio: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,27	0,07	1,24
Variabilidade Intra-Ensaio: <i>Controlo interno</i>	0,11	0,01	0,72
Variabilidade Inter-Lote: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,47	0,07	1,44
Variabilidade Inter-Lote: <i>Controlo interno</i>	0,19	0,03	1,23
Variância Total: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	0,26	0,07	1,17
Variância Total: <i>Controlo interno</i>	0,15	0,02	1,02

Tabela 3: Dados de precisão para os valores quantitativos (em cópias/ $\mu$ l).

	Desvio Padrão	Variância	Coefficiente de variação [%]
Variabilidade Intra-Ensaio: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,36	1,85	13,48
Variabilidade Inter-Ensaio: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,68	2,83	16,61
Variabilidade Inter-Lote: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,33	1,77	13,19
Variância Total: <i>EBV LC/RG/TM QS 4</i>	1,47	2,16	14,54

## 11.4 Reprodutibilidade

Os dados da reprodutibilidade permitem avaliar regularmente o desempenho do *artus* EBV LC PCR Kit, assim como compará-lo com o desempenho de outros produtos através da participação em ensaios colaborativos de controlo externo de qualidade.

## 11.5 Avaliação diagnóstica

O *artus* EBV LC PCR Kit está a ser avaliado em vários estudos.

## 12. Indicações especiais sobre a utilização do produto

- Todos os reagentes devem ser utilizados exclusivamente para o diagnóstico in vitro.
- A utilização deve ser efectuada por funcionários que tenham sido especialmente formados e instruídos no processo de diagnóstico in vitro.
- A observância exata do protocolo é impreterivelmente necessária para se otimizar o resultado da PCR.
- Ter em atenção a data de validade indicada na embalagem e nas etiquetas de cada componente. Não utilizar reagentes com prazo de validade expirado.

## 13. Avisos e precauções

As informações de segurança do *artus* EBV LC PCR Kit podem ser obtidas nas Páginas de dados de Segurança (safety data sheets, SDS). Elas podem ser obtidas de na forma de informações PDF compactas e fáceis de utilizar em [www.qiagen.com/support/msds.aspx](http://www.qiagen.com/support/msds.aspx).









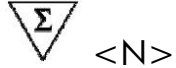

## **14. Controlo de qualidade**

De acordo com o Sistema de Administração de Qualidade certificado pelos ISO 9001 e ISO 13485 da QIAGEN, cada lote dos *artus* EBV LC PCR Kits foi testado de acordo com as especificações anteriormente apresentadas a fim de garantir a qualidade do produto.

## **15. Referência bibliográfica**

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

## 16. Descrição dos Símbolos

	Prazo de Validade
	Número do Lote
	Fabricante
	Referência de Catálogo
	Número do material
	Manual de instruções
	Produto medico diagnosticado in vitro
	Número do item de comércio mundial
	Conteúdo é suficiente para <N> testes
	Limites de Temperatura
<b>QS</b>	<i>Padrão de quantificação</i>
<b>IC</b>	<i>Controlo interno</i>



artus EBV LC PCR Kit

Marcas registradas e indicações jurídicas

QIAGEN®, QIAamp®, artus®, BioRobot®, EZ1®, UltraSens® (Grupo QIAGEN); LightCycler® (Roche Group).

Nomes registrados, marcas registradas, etc. usados neste documento não podem ser considerados como desprotegidos legalmente, mesmo que não estejam especificamente sinalizados como tal.

O artus EBV LC PCR Kit, o BioRobot EZ1 DSP Workstation, e o EZ1 DSP Virus Kit e Card são instrumentos e kits de diagnóstico sinalizados com CE de acordo com as Diretrizes Europeias 98/79/CE sobre diagnóstico in vitro. Não estão disponíveis em todos os países.

Os kits QIAamp são para o uso geral em laboratório. As indicações ou as representações do produto não foram elaboradas para fornecer informações sobre a diagnose, a prevenção ou a terapia de uma doença.

A aquisição de kits de PCR artus contém uma licença limitada para o uso dos mesmos na execução do processo de reacção em cadeia da polimerase (PCR) em diagnósticos in vitro humanos e veterinários em conjunção com um ciclador térmico, cujo uso na execução automática do processo de PCR é coberto pela taxa de licença inicial, ou por pagamento à Applied Biosystems ou por aquisição de um ciclador térmico autorizado. O processo de PCR é protegido pelos respectivos direitos nacionais de protecção de patentes dos E.Li.A. número: 5.219.727 e 5.322.770 e 5.210.015 e 5.176.995 e 6.040.166 e 6.197.563 e 5.994.056 e 6.171.785 e 5.487.972 e 5.804.375 e 5.407.800 e 5.310.652 e 5.994.056; Propriedade da Firma Hoffmann-La Roche Ltda.

© 2015 QIAGEN, todos os direitos reservados

---

**www.qiagen.com**

**Australia** ■ techservice-au@qiagen.com

**Austria** ■ techservice-at@qiagen.com

**Belgium** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Brazil** ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

**Canada** ■ techservice-ca@qiagen.com

**China** ■ techservice-cn@qiagen.com

**Denmark** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Finland** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**France** ■ techservice-fr@qiagen.com

**Germany** ■ techservice-de@qiagen.com

**Hong Kong** ■ techservice-hk@qiagen.com

**India** ■ techservice-india@qiagen.com

**Ireland** ■ techservice-uk@qiagen.com

**Italy** ■ techservice-it@qiagen.com

**Japan** ■ techservice-jp@qiagen.com

**Korea (South)** ■ techservice-kr@qiagen.com

**Luxembourg** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Mexico** ■ techservice-mx@qiagen.com

**The Netherlands** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Norway** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Singapore** ■ techservice-sg@qiagen.com

**Sweden** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Switzerland** ■ techservice-ch@qiagen.com

**UK** ■ techservice-uk@qiagen.com

**USA** ■ techservice-us@qiagen.com

