

# artus<sup>®</sup> SARS RG RT-PCR Kit

## Manual de Instruções



24 (Catálogo Nr. 4511263)

Diagnóstico in vitro quantitativo

Para utilização com os equipamentos  
artus<sup>™</sup> 3000 e o Rotor-Gene<sup>®</sup> 3000

Versão 1



4511263



1046936PT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R2

**MAT**

1046936PT



## **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>10</b>
<b>6. Princípio da PCR em Tempo Real (Real-TimePCR) .....</b>	<b>11</b>
<b>7. Descrição do produto.....</b>	<b>11</b>
<b>8. Protocolo .....</b>	<b>12</b>
8.1 Pré-analítica: colheita, conservação e transporte de amostras.....	12
8.2 Isolamento de ARN .....	14
8.3 Controlo interno .....	16
8.4 Quantificação.....	17
8.5 Preparação da PCR.....	18
8.6 Programação do <i>artus 3000</i> ou do .....	23
<b>9. Análise dos dados .....</b>	<b>24</b>
<b>10. Resolução de problemas .....</b>	<b>26</b>
<b>11. Especificações .....</b>	<b>28</b>
11.1 Sensibilidade analítica .....	28
11.2 Especificidade.....	30
11.3 Precisão .....	31
11.4 Robustez.....	32

11.5 Reprodutibilidade .....	33
11.6 Avaliação diagnóstica .....	33
<b>12. Indicações especiais sobre a utilização do produto .....</b>	<b>33</b>
<b>13. Informações de segurança .....</b>	<b>33</b>
<b>14. Controlo de qualidade .....</b>	<b>34</b>
<b>15. Referência bibliográfica .....</b>	<b>34</b>
<b>16. Descrição dos símbolos .....</b>	<b>35</b>

## artus SARS RG RT-PCR Kit

Para utilização com o *artus 3000* ou com o *Rotor-Gene 3000*.

### 1. Conteúdo

	Legenda e conteúdo	NºArt. 4511263 24 reacções
Azul	SARS-CoV RG/TM Master	2 x 12 rxns
Vermelho	SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 <sup>†</sup> 1 x 10 <sup>4</sup> cop/μl	1 x 200 μl
Vermelho	SARS-CoV LC/RG/TM QS 2 <sup>†</sup> 1 x 10 <sup>3</sup> cop/μl	1 x 200 μl
Vermelho	SARS-CoV LC/RG/TM QS 3 <sup>†</sup> 1 x 10 <sup>2</sup> cop/μl	1 x 200 μl
Vermelho	SARS-CoV LC/RG/TM QS 4 <sup>†</sup> 1 x 10 <sup>1</sup> cop/μl	1 x 200 μl
Verde	SARS-CoV LC/RG/TM IC <sup>‡</sup>	1 x 1.000 μl
Branco	Water (PCR grade)	1 x 1.000 μl

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

### 2. Conservação

Os componentes do *artus SARS RG RT-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 ARN (ver capítulo 8.2 Isolamento de ARN)
- Pipetas (reguláveis)
- Pontas de pipetas estéreis com filtros
- Misturador vórtex
- Centrífuga de mesa com rotor para tubos de reacção de 2 ml
- *artus 3000* ou *Rotor-Gene 3000*
- Tubos de reacção de PCR de 0,1 ml para a utilização do rotor de 72 poços (0.1 ml Strip Tubes and Caps, QIAGEN Hamburg, Cat. No.: 4699982; 0.1 ml tubes, Corbett Research, Cat. No.: ST-1001)
- Alternativa: tubos de reacção de PCR de 0,2 ml para utilização do rotor de 36 poços (p. ex. 0.2 ml PCR Tubes, QIAGEN Hamburg, Cat. No.: 4699983; 0.2 ml tubes, Corbett Research, Cat. No.: SE-1003F)
- Bloco de refrigeração (72-/96-Well Loading Block, QIAGEN Hamburg, Cat. No.: 4699980/4699981; 72/96 well loading block, Corbett Research, Cat. No.: 3001-008/3001-009)

### 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 num bloco de refrigeração (72/96 well loading block).



## 5. Informações acerca do agente patogénico

Os Coronavírus pertencem à família dos *Coronaviridae* e são vírus grandes com cápsula e ARN de cadeia positiva que provocam doenças altamente virulentas em humanos e animais domésticos. Dois coronavírus humanos, até hoje conhecidos, são responsáveis por um terço das constipações comuns e das infecções nosocomiais das vias respiratórias superiores nos bebés prematuros.

Um novo membro da família dos Coronavírus é o causador da “Síndrome Respiratória Aguda Grave” (“Severe Acute Respiratory Syndrom”, SARS). Um fragmento do genoma da polimerase do SARS-Coronavírus (SARS-CoV) foi identificado em um doente, por meio de reacção de polimerização em cadeia (PCR), pelo Instituto de Medicina Tropical Bernhard-Nocht em Hamburgo e laboratórios colaboradores. Com base nestes testes, foi desenvolvido um sistema comercial de RT-PCR em Tempo Real para a detecção directa do SARS-CoV. A PCR pode detectar material genético do SARS-CoV em diferentes amostras (sangue, secreções das vias respiratórias ou tecidos).

### Avaliação dos resultados dos testes

**Importante:** Por favor observar com atenção as indicações oficiais da Organização Mundial de Saúde (OMS) na seguinte página de Internet: <http://www.who.int/csr/sars/guidelines/en>.

**Resultados positivos dos testes:** Um teste positivo de SARS-CoV indica a existência de uma infecção pelo SARS-CoV, mesmo que o doente não apresente nenhum sintoma da SARS.

**Resultados negativos dos testes:** Um teste negativo do SARS-CoV não exclui a possibilidade de o doente estar com SARS. Os motivos para um resultado negativo do teste, apesar dos sintomas da SARS, podem ser:



- No momento da colheita da amostra, o vírus não estava contido no material de amostra (ainda não se sabe em que estágio da patogénese do SARS-CoV o vírus pode ser detectado numa determinada amostra).
- O doente apresenta sintomas semelhantes aos da SARS que são causados por um outro agente patogénico.

## **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 SARS RG RT-PCR Kit* é um sistema pronto a utilizar para a detecção de ARN do SARS-CoV através da reacção de polimerização em cadeia (PCR) no equipamento *artus 3000* ou no *Rotor-Gene 3000*. A *SARS-CoV RG/TM Master* contém os reagentes e enzimas para a transcrição reversa e amplificação específica de uma região de 92 pb do genoma do SARS-CoV, assim como para a detecção directa do material amplificado no canal de fluorescência Cycling A.FAM do *artus 3000* ou do *Rotor-Gene 3000*. Ao mesmo tempo, o *artus SARS RG RT-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 Cycling A.JOE. O limite de detecção da RT-PCR analítica do SARS-CoV não é reduzido (ver capítulo **11.1 Sensibilidade analítica**). São fornecidos controlos positivos externos (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4), que permitem a determinação da carga de agente patogénico (ver capítulo **8.4 Quantificação**)

## **8. Protocolo**

### **8.1 Pré-analítica: colheita, conservação e transporte de amostras**

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

**Importante:** Estudos correntes indicam que a expectoração é o material de amostras mais adequado para a detecção do SARS-CoV. Aconselhamos, por isto, a utilização deste material com o *artus SARS RG RT-PCR Kit*.

A validação interna do *artus SARS RG RT-PCR Kit* foi efectuada com amostras de soro. Outros materiais de amostras, como expectorações, lavados bronco-alveolares (LBA), lavados nasofaríngeos, raspagens e tecido pulmonar ainda não foram totalmente validados. Por favor, utilize somente o kit de isolamento de ARN recomendado (ver **8.2 Isolamento de ARN**) para a preparação da amostra.

Em certos materiais de amostras, devem ser considerados os regulamentos especiais relativos à colheita, conservação e transporte.

**Atenção:** Levar também em consideração as recomendações oficiais da OMS, que se encontram na seguinte página de Internet: <http://www.who.int/csr/sars/sampling/en/>.

### **8.1.1 Colheita de amostras**

Para colher amostras de raspagem, utilizar os seguintes materiais:

Utilizar exclusivamente zaragatoas de raspagem com extremidades de Dacron<sup>®</sup> ou raiom e hastes de plástico. **Não utilizar zaragatoas de raspagem com haste de alumínio ou de madeira.**

### **8.1.2 Conservação de amostras**

*A eficácia do teste pode ser prejudicada pela congelação repetida ou por uma conservação mais longa das amostras.*

As amostras devem ser conservadas a uma temperatura de 2 a 8°C. Se as amostras de raspagem tiverem que ser enviadas para um laboratório de pesquisa, elas devem ser despachadas o mais rápido possível após a colheita, de acordo com o regulamento do laboratório relativo ao transporte de amostras de SARS-CoV.

Amostras de raspagem que não são directamente testadas após a entrada no laboratório devem ser conservadas a uma temperatura de 2 a 8°C e devem ser analisadas num período de um dia. Amostras de raspagem que não puderem ser analisadas num período de um dia após a colheita devem ser conservadas a -20°C, ou menos, e testadas num período de 30 dias após a data da colheita.

### **8.1.3 Transporte de amostras**

Amostras de raspagem devem ser transportadas refrigeradas.

Se as amostras de raspagem tiverem que ser enviadas para um laboratório, elas devem ser despachadas o mais rápido possível após a colheita, de acordo com o regulamento do laboratório relativo ao transporte refrigerado.

As amostras têm que ser enviadas de acordo com os regulamentos locais e estatais relativos ao transporte de materiais causadores de doenças\*.

## 8.2 Isolamento de ARN

Os kits de isolamento de ARN 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 ARN conforme as instruções do fabricante. Os seguintes kits de isolamento são recomendados:

Material de Amostra	Kit de Purificação	Número de Catálogo	Fabricante	Carrier-ARN
Expectoração, soro, LBA, lavado nasofaríngeo,	QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)	52 904	QIAGEN	contém
Tecido pulmonar	RNeasy Mini Kit (50)	74 104	QIAGEN	não contém

**Na utilização de expectoração como material de amostra, ter em atenção as seguintes instruções:** Para preparar as amostras, misture-as em um tubo de reacção em igual volume com uma solução de NaCl de 0,9 %, que contém 1 % de N-Acetil-Cisteína (Sigma Cat. No. A8199) (p. ex. 300 µl de Expectoração + 300 µl de mistura de NaCl). Depois de uma incubação da mistura durante 30 minutos, à temperatura ambiente, utilizar 140 µl do material lisado para a purificação de ARN com o QIAamp Viral RNA Mini Kit e seguir as indicações constantes do protocolo do fornecedor.

---

\* International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition, 2000.704.

- A adição de **Carrier-ARN** é de grande importância para a eficiência da extração e conseqüentemente para o rendimento do isolamento do ADN/ARN. Para obter uma estabilidade maior do Carrier-ARN fornecido no QIAamp Viral RNA Mini Kit, recomendamos o procedimento a seguir, diferente do indicado nas instruções do kit de isolamento:
  - a. Antes da primeira utilização do kit de isolamento, ressuspender 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, dividir 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.
  - b. 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 **8.3 Controlo interno**) de acordo com o seguinte esquema de pipetagem.

Número de amostras	1	12
Tampão de lise AVL	560 $\mu\text{l}$	6720 $\mu\text{l}$
Carrier-ARN (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	5,6 $\mu\text{l}$	67,2 $\mu\text{l}$
<b>Volume Total</b>	<b>565,6 <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>6787,2 <math>\mu\text{l}</math></b>
<b>Volume para a purificação</b>	<b>560 <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>cada 560 <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
- 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 SARS RG RT-PCR Kit* não deverá ser utilizado em conjunto com procedimentos de purificação que utilizam **fenol** como base.

**Importante:** O *Controlo interno* do *artus SARS RG RT-PCR Kit* pode ser

adicionado directamente na fase de purificação (ver capítulo **8.3 Controlo interno**).

## 8.3 Controlo interno

É fornecido um *Controlo interno* (SARS-CoV LC/RG/TM IC) com o qual setem a possibilidade de controlar **não só a purificação do ARN como também uma possível inibição da PCR** (ver Fig. 1). Para este fim, adicioneo *Controlo interno* numa relação de 0,1  $\mu$ l por 1  $\mu$ l do volume de eluição na purificação. Se utilizar, por exemplo, o QIAamp Viral RNA Mini Kit e eluir o ARN em 60  $\mu$ l de tampão AVE, então acrescentar 6  $\mu$ l de *Controlo interno*. Se, p. ex., eluir em 50  $\mu$ l, então acrescentar respectivamente 5  $\mu$ l. A quantidade de *Controlo interno* acrescentada depende **apenas** do volume de eluição. O *Controlo interno* e eventualmente o Carrier-ARN (ver capítulo

**8.2 Isolamento de ARN**) 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, 1  $\mu$ l de *Controlo interno* directamente a 15  $\mu$ l de SARS-CoV RG/TM Master. Utilize para cada reacção de PCR 15  $\mu$ l da Master Mix\* desta forma produzida e adicione, em seguida, 10  $\mu$ l de amostra purificada. Se tiver que preparar um ensaio com várias amostras, então aumente as quantidades necessárias de SARS-CoV RG/TM Master e de

*Controlo interno* proporcionalmente ao número de amostras (ver capítulo 8.5 Preparação da PCR).

## 8.4 Quantificação

Os *Padrões de quantificação* fornecidos (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) foram calibrados de acordo com os padrões do Instituto Robert Koch, Berlin. Os mesmos são tratados como uma amostra purificada e utilizados no mesmo volume (10  $\mu$ l). Para criar uma curva padrão no *artus 3000* ou no *Rotor-Gene 3000*, utilize todos os quatro Padrões de quantificação fornecidos, defina-os na janela do menu *Edit Samples* como padrões e introduza as concentrações indicadas (ver *artus 3000 Software Manual* ou *Rotor-Gene Manual, Versão 4.6*). 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 *artus 3000 Software Manual* ou *Rotor-Gene Manual, Versão 4.6*). Porém, nesta forma de quantificação, deve ser levado em consideração que, devido à

---

\* 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.

variabilidade entre os ensaios da PCR, podem ocorrer desvios nos resultados.

**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).

**Importante:** Para facilitar a análise quantitativa dos dados do sistema *artus* no *artus 3000* ou no *Rotor-Gene 3000*, encontra-se em [www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX](http://www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX) um guia (Technical Note for quantitation on the *artus 3000* or *Rotor-Gene 3000*).

## 8.5 Preparação da PCR

Certifique-se de que o bloco de refrigeração (acessório do *artus 3000* ou do *Rotor-Gene 3000*) tenha sido pré-refrigerado a aproximadamente +4°C. Coloque, para as reacções planeadas, a quantidade necessária de tubos de reacção de PCR. 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 (*SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4*). Antes do início do teste todos os reagentes devem ser totalmente descongelados à temperatura ambiente, bem misturados (pipetando para cima e para baixo várias vezes ou invertendo o



tubo de reacção repetidamente) e em seguida brevemente centrifugados.

Se desejar controlar, com o *Controlo interno*, não só a purificação do ARN como também uma possível inibição da PCR, o *Controlo interno* já deverá ter sido introduzido previamente na fase de purificação (ver capítulo

**8.3 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	SARS-CoV RG/TM Master	15 µl	180 µl
	SARS-CoV LC/RG/TMIC	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	10 µl	cada 10 µl
	<b>Volume Total</b>	<b>25 µl</b>	<b>cada 25 µl</b>

Se desejar utilizar o *Controlo interno* exclusivamente para o controlo de uma inibição da PCR, então adicione-o directamente à SARS-CoV RG/TM 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	SARS-CoV RG/TM Master	15 µl	180 µl
	SARS-CoV LC/RG/TMIC	1 µl	12 µl
	<b>Volume Total</b>	<b>16 µl*</b>	<b>192 µl*</b>
2. Preparação da Reacção de PCR	Master Mix	15 µl*	cada 15 µl*
	Amostra	10 µl	cada 10 µl
	<b>Volume Total</b>	<b>25 µl</b>	<b>cada 25 µl</b>

Pipete para cada tubo de reacção de PCR 15 µl da Master Mix. Em seguida, adicione 10 µl de eluído do isolamento de ARN e misture bem, pipetando para cima e para baixo várias vezes. De forma correspondente, devem ser colocados, como controlo positivo, 10 µl de pelo menos um dos Padrões de quantificação (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) e, como controlo negativo,

\* 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.

10  $\mu$ l de água (*Water, PCR grade*). Tape os tubos de reacção de PCR Ter em atenção que deve ser aplicado um *Locking Ring* (acessório do *artus 3000* ou do *Rotor-Gene 3000*) no rotor para evitar uma abertura involuntária dos tubos de reacção durante o ensaio.

## Adição do Controlo interno para a purificação

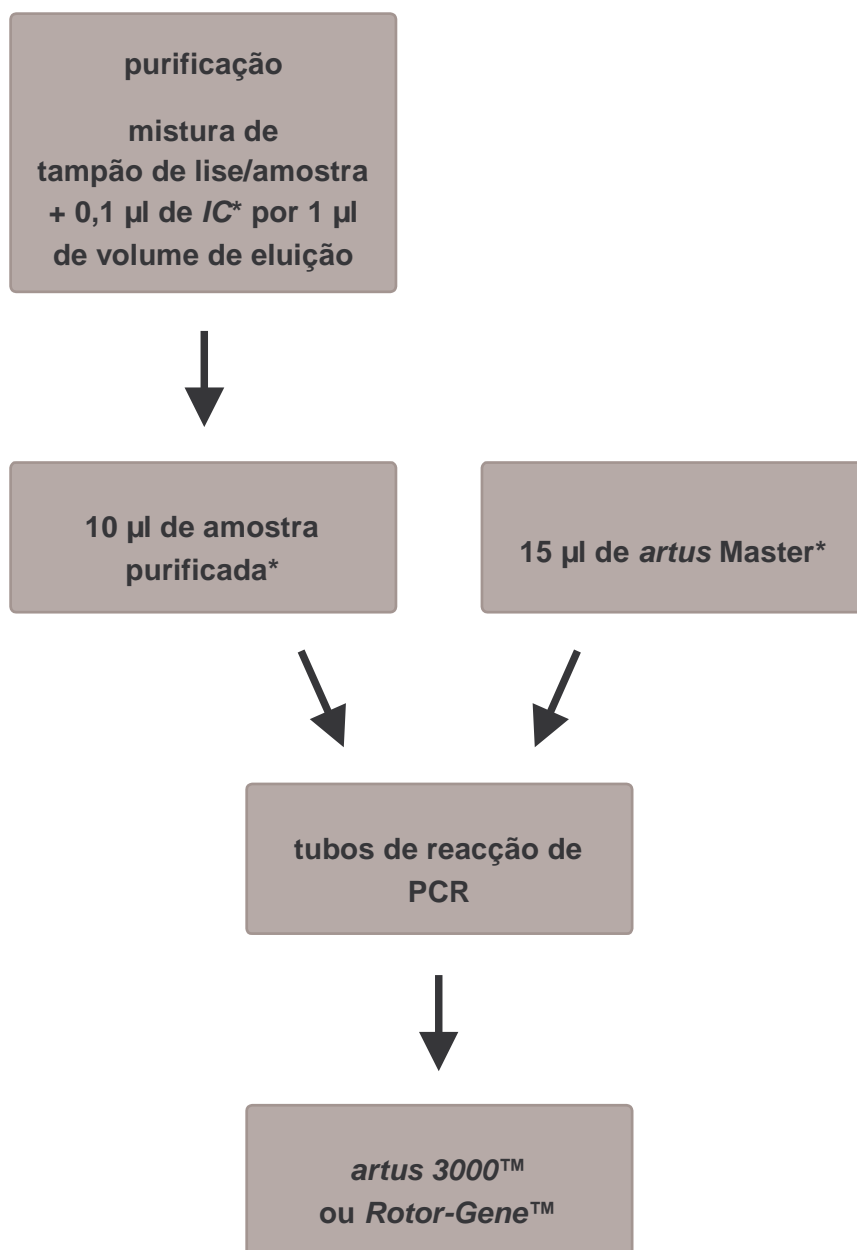


Fig. 1: Fluxo esquemático da operação para o controlo da purificação e da inibição da PCR.

\*

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

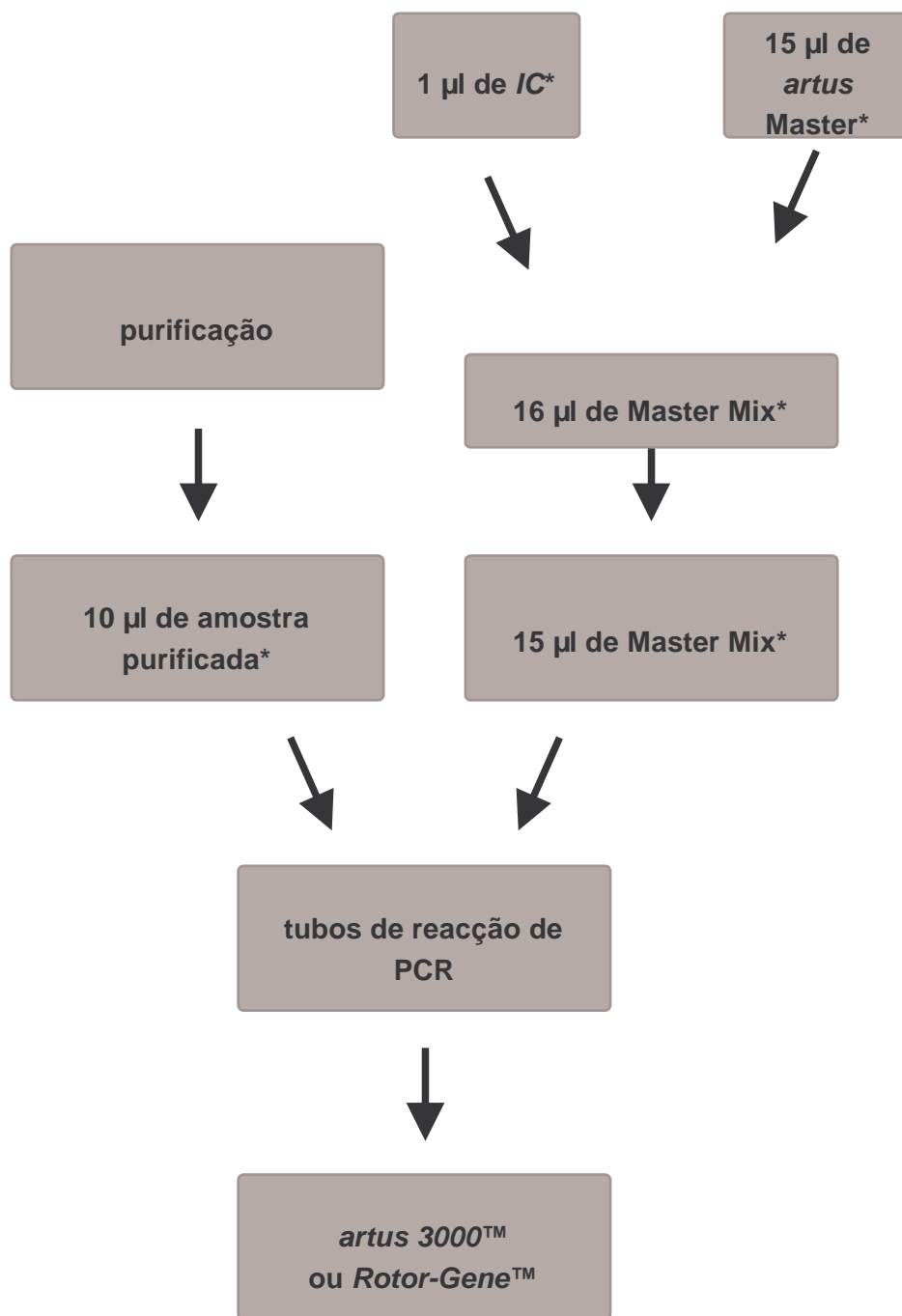


Fig. 2: Fluxo esquemático da operação para o controlo da inibição da PCR.

\*

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

## 8.6 Programação do *artus 3000* ou do

### *Rotor-Gene™ 3000*

Para a detecção de ARN do SARS-CoV, crie no seu *artus 3000* ou no *Rotor-Gene 3000* um perfil de temperatura com os seguintes seis passos (conforme as Fig. 3 a 8):

- |    |  |        |
|----|--|--------|
| A. | Configuração dos parâmetros gerais de PCR                          | Fig. 3 |
| B. | Transcrição reversa do ARN   | Fig. 4 |
| C. | Activação inicial da enzima Hot Start                              | Fig. 5 |
| D. | Amplificação do cADN   | Fig. 6 |
| E. | Configuração da sensibilidade dos canais de fluorescência          | Fig. 7 |
| F. | Início do ensaio do <i>artus 3000</i> ou do <i>Rotor-Gene 3000</i> | Fig. 8 |

Todas as indicações referem-se à versão 5.0.69 do software do *artus 3000* ou à versão 4.6.94 do software *Rotor-Gene™*. Para mais particularidades sobre a programação do *artus 3000* ou do *Rotor-Gene 3000*, consulte o *artus 3000 Software Manual* ou o *Rotor-Gene Manual*, versão 4.6. Estas configurações estão destacadas nas figuras com caixa a negro.

Em primeiro lugar, introduza o volume de reacção da PCR para a janela do menu *New Experiment Wizard* (ver Fig. 3).

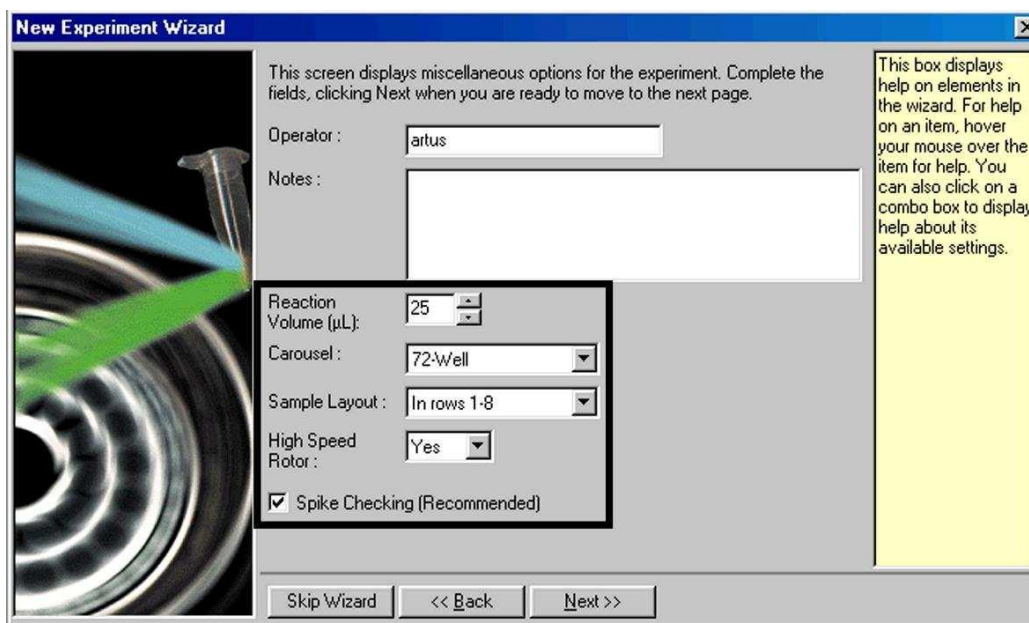


Fig. 3: Configuração dos parâmetros gerais de PCR.

A programação do perfil de temperatura é efectuada através da activação da função *Edit* na janela seguinte do menu *New Experiment Wizard* (ver Fig. 4, 5 e 6).

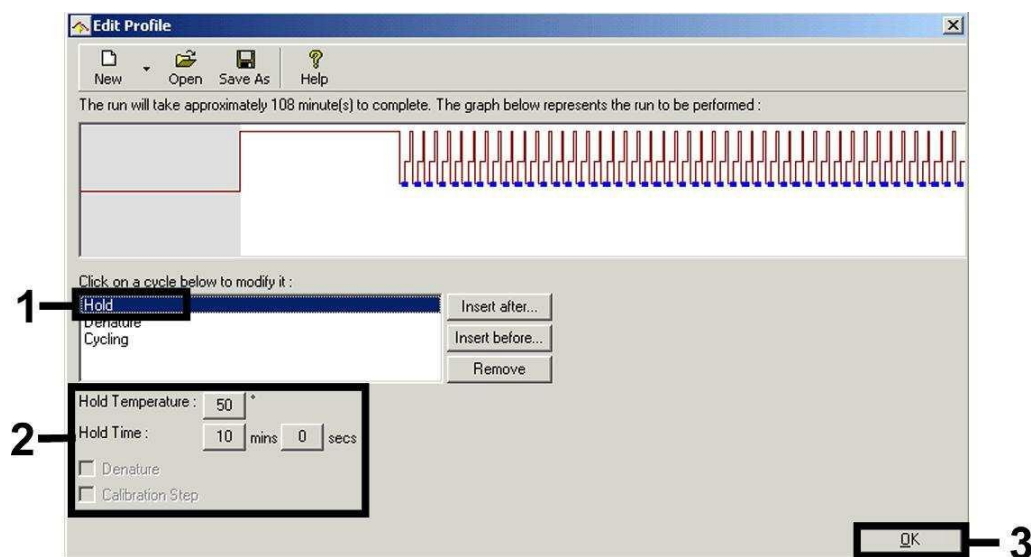


Fig. 4: Transcrição reversa do ARN.

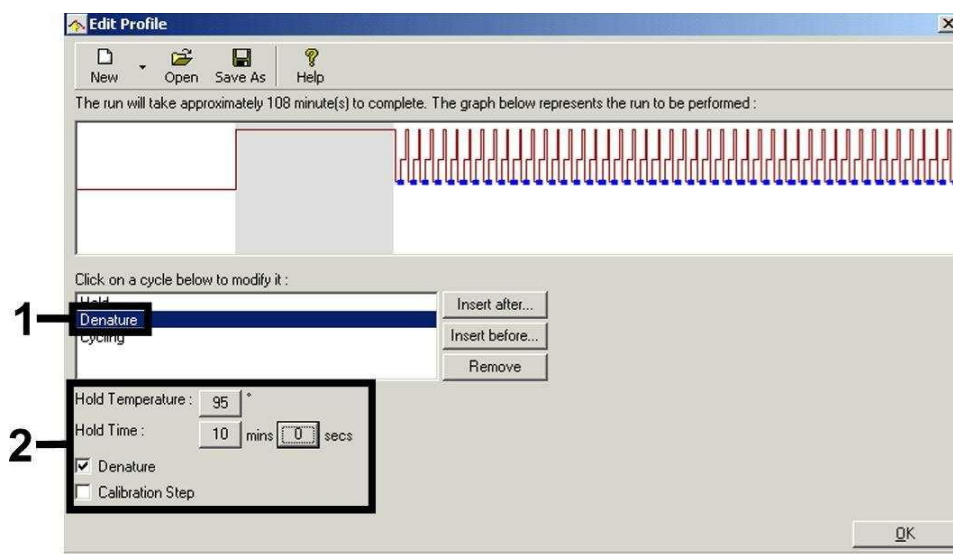


Fig. 5: Activação inicial da enzima Hot Start.

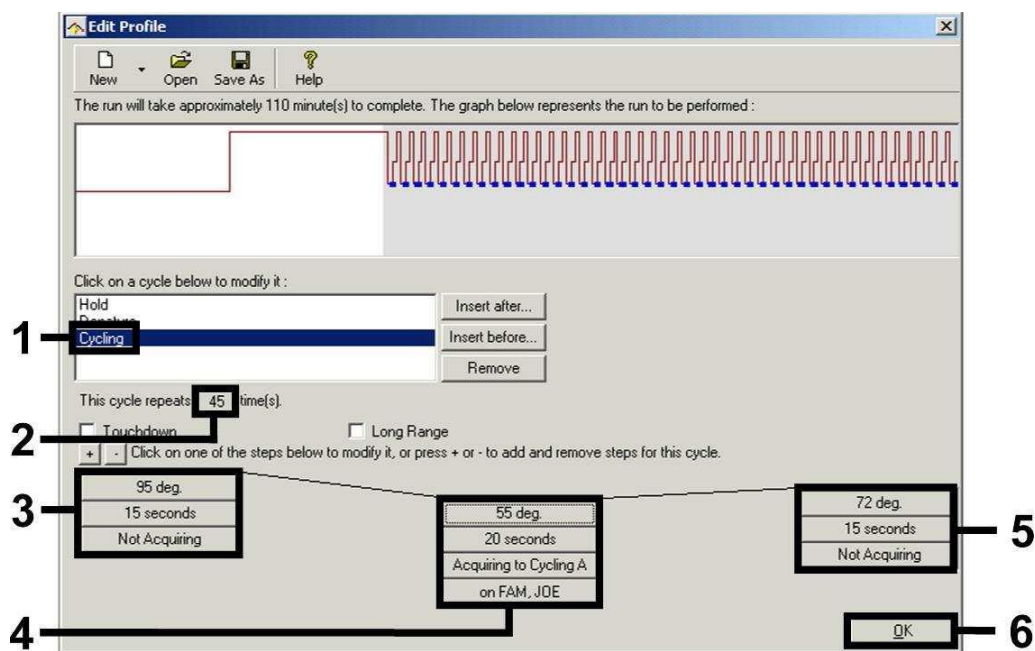


Fig. 6: Amplificação do cADN.

Os limites de detecção dos canais de fluorescência têm que ser determinados de acordo com as intensidades de fluorescência nos tubos de PCR. Esta configuração efectua-se na janela do menu *Auto Gain Calibration Setup* (activação na janela do menu *New Experiment Wizard* em *Calibrate*). Ajuste a temperatura de calibração de acordo com a temperatura de emparelhamento (annealing) do programa de amplificação (ver Fig. 7).

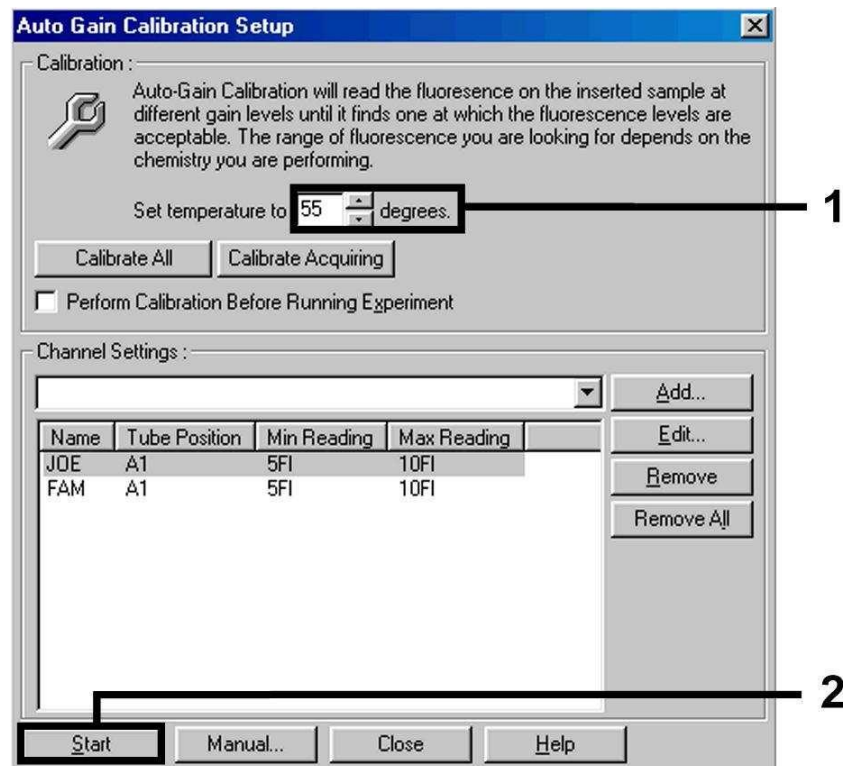


Fig. 7: Configuração da sensibilidade dos canais de fluorescência.



Os valores *Gain*, apurados através da calibração do canal, serão automaticamente gravados e estão apresentados na última janela do menu da programação (ver Fig. 8).

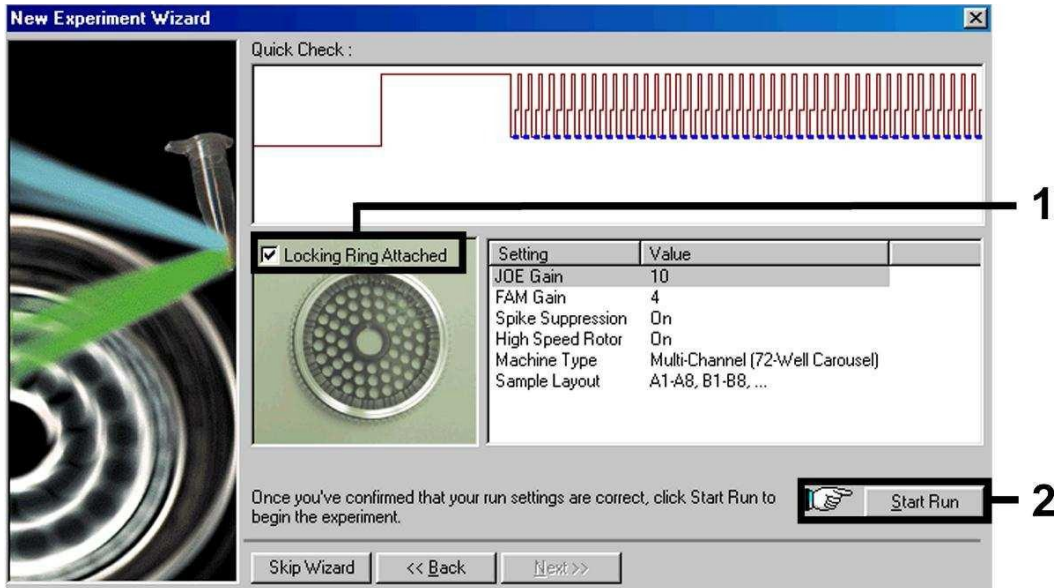


Fig. 8: Início do ensaio do *artus 3000* ou do *Rotor-Gene 3000*.

## 9. Análise dos dados

A análise dos dados efectua-se com o software do *artus 3000* ou do *Rotor-Gene* conforme instrução do fabricante (*artus 3000 Software Manual* ou o *Rotor-Gene Manual, Versão 4.6*).

Os seguintes resultados podem ser obtidos:

1. É detectado um sinal no canal de fluorescência Cycling A.FAM.

**O resultado da análise é positivo: A amostra contém ARN do SARS-CoV.**

Neste caso, a detecção de um sinal no canal Cycling A.JOE é secundária, pois elevadas concentrações iniciais de ARN do SARS-CoV (sinal positivo no canal Cycling A.FAM) podem conduzir a uma redução ou até mesmo à ausência do sinal de fluorescência do *Controlo interno* no canal Cycling A.JOE (competição).

2. Não é detectado nenhum sinal no canal de fluorescência Cycling A.FAM e é detectado um sinal no canal Cycling A.JOE (sinal do *Controlo interno*).

**Na amostra não é detectável nenhum ARN do SARS-CoV, por isso ela pode ser considerada negativa.**

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

3. Nenhum sinal é detectado, nem no canal Cycling A.FAM e nem no canal Cycling A.JOE.

**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. 9 e Fig. 10.

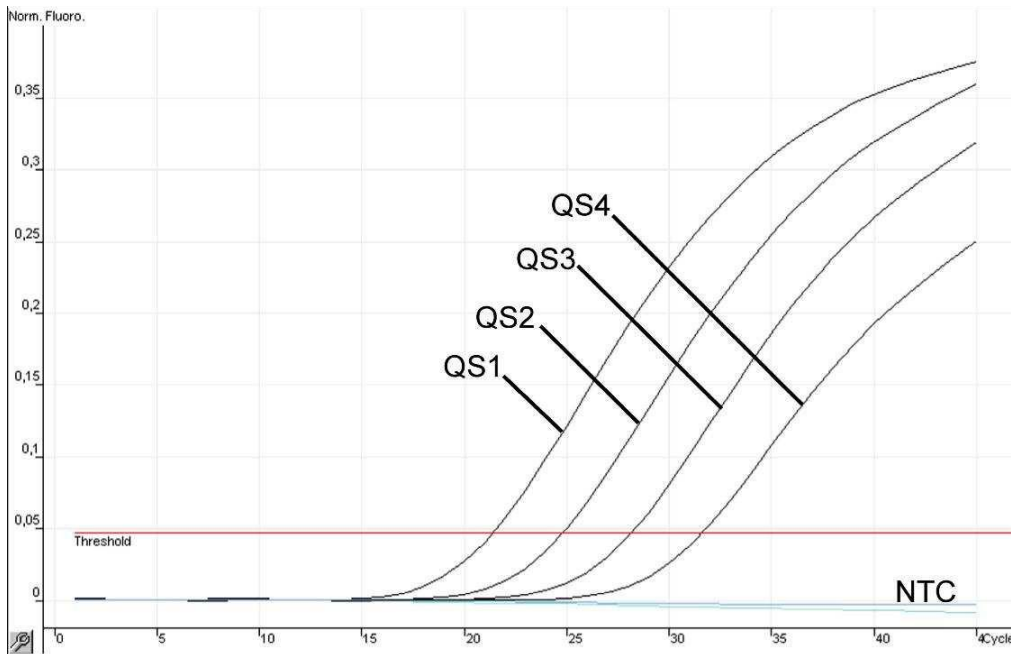


Fig. 9: Detecção dos Padrões de quantificação (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) no canal de fluorescência Cycling A.FAM. NTC: non-template control (controlo negativo).

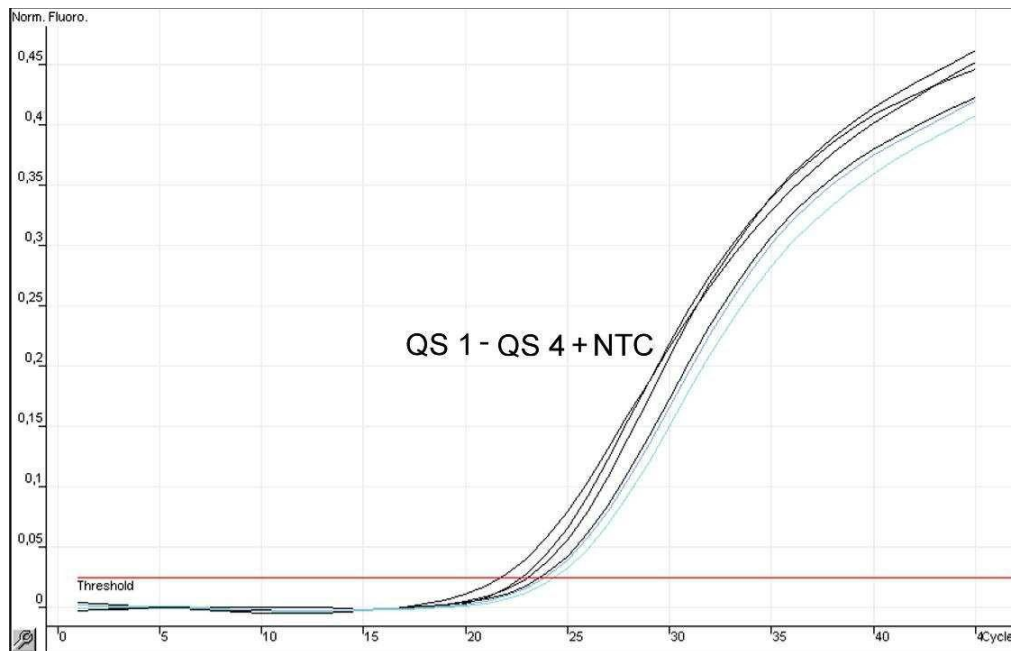


Fig. 10: Detecção do Controlo interno (IC) no canal de fluorescência Cycling A.JOE no caso de amplificação simultânea dos Padrões de quantificação (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (controlo negativo).

## 10. Resolução de problemas

Ausência de sinal no canal de fluorescência Cycling A.FAM nos controlos positivos (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4):

- 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 Cycling A.FAM para a RT-PCR analítica do SARS-CoV e o canal de fluorescência Cycling A.JOE para a RT-PCR do *Controlo interno*.
- A programação do perfil de temperatura do *artus 3000* ou do *Rotor-Gene 3000* estava incorrecta.
  - ❖ Compare o perfil de temperatura com as indicações do protocolo (ver capítulo **8.6 Programação do artus 3000 ou do Rotor-Gene 3000**).
- Composição incorrecta da reacção de PCR.
  - ❖ Reveja os passos com ajuda do esquema de pipetagem (ver capítulo **8.5 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 SARS RG RT-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 Cycling A.JOE, em caso de ausência simultânea de um sinal no canal Cycling A.FAM:

- 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 **8.2 Isolamento de ARN**) 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 ARN (ver capítulo **8.2 Isolamento de ARN**).
- Ocorreram perdas de ARN 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 ARN por causa da purificação. Certifique-se de que seja utilizado um dos nossos procedimentos de purificação recomendados (ver capítulo **8.2 Isolamento de ARN**) e, seja fiel às instruções do fabricante.
- As condições de conservação para um ou mais componentes do kit não corresponderam às instruções do *artus SARS RG RT-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 Cycling A.FAM da RT-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* SARS RG RT-PCR Kit, foi criada uma série de diluições padrão de 10 a aproximadamente 0,003 cópias transcritas *in vitro* por  $\mu\text{l}$  de ARN do amplicon do SARS-CoV, e esta foi analisada com o *artus* SARS RG RT-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. 11. O limite de detecção ( $p = 0,05$ ) do *artus* SARS RG RT-PCR Kit está, desta forma, estabelecido em 0,5 cópias/ $\mu\text{l}$ . Isto significa que existe uma probabilidade de 95 % de serem detectadas 0,5 cópias/ $\mu\text{l}$ .

#### Análise de probit: SARS-Coronavirus (*artus* 3000/Rotor-Gene 3000)

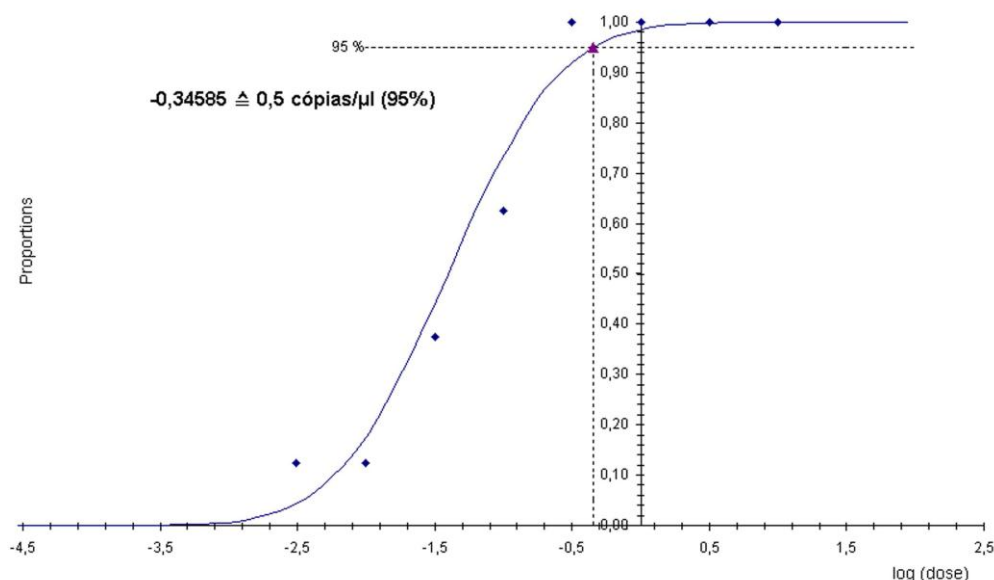


Fig. 11: Sensibilidade analítica do *artus* SARS RG RT-PCR Kit.



## 11.2 Especificidade

A especificidade do *artus* SARS RG RT-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 subtipos e genótipos relevantes .

Adicionalmente, a validação da especificidade foi realizada com 30 diferentes amostras de soro negativas para o SARS-CoV que não geraram sinal com os iniciadores (primers) e sondas específicas para o SARS-CoV contidos na *SARS-CoVRG/TMMaster*.

Para a determinação da especificidade do *artus* SARS RG RT-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	SARS-CoV (Cycling A FAM)	Controlo interno (Cycling A.JOE)
HCoV OC 43 ATCC (Human coronavirus OC 43)	-	+
HCoV 229 E ATCC (Human coronavirus 229 E)	-	+
SB 1 + 4 HCoV (Human coronavirus SB 1 + 4)	-	+
SB 164 HCoV (Human coronavirus SB 164)	-	+
IBV Beaudelle (Avian infectious bronchitis virus Beaudelle)	-	+
BCV 212 (Bovine CoV212)	-	+
TGEV Perdue (Porcine transmissible gastroenteritis virus Perdue)	-	+



TGEV Pur 46 C 188 (Porcine transmissible gastroenteritis virus Pur)	-	+
---	---	---

### 11.3 Precisão

Os dados de precisão para o *artus* SARS RG RT-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* SARS RG RT-PCR Kit com base no *Padrão de quantificação* com a menor concentração (QS 4; 10 cópias/ $\mu$ l). As análises foram efectuadas contendo oito determinações. Os resultados do teste de precisão estão representados nos valores do Ct da curva de amplificação (Ct: *threshold cycle*, ver Tabela 2). De acordo com estes resultados, a flutuação estatística de uma amostra qualquer com a concentração determinada é de 1,66 % e para a detecção do *Controlo interno* é de 1,28 %. 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>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,15	0,02	0,48
Variabilidade Intra-Ensaio: <i>Controlo interno</i>	0,40	0,15	1,67
Variabilidade Inter-Ensaio: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,23	0,05	0,75
Variabilidade Inter-Ensaio: <i>Controlo interno</i>	1,13	1,28	4,53
Variabilidade Inter-Lote: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,52	0,25	1,69
Variabilidade Inter-Lote: <i>Controlo interno</i>	0,94	0,63	3,62
Variância Total: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,51	0,26	1,66
Variância Total: <i>Controlo interno</i>	1,13	1,28	1,28

## 11.4 Robustez

A verificação da robustez serve para apurar a taxa total de erro do *artus SARS RG RT-PCR Kit*. Para isso, foram misturadas 30 amostras de soro negativas para o SARS-CoV, com 1,5 cópias/ $\mu$ l por volume de eluição de ARN de controlo de SARS-CoV (três vezes a concentração dos limites de sensibilidade analíticos). As amostras foram purificadas com o QIAamp Viral RNA Mini Kit e analisadas com o *artus SARS RG RT-PCR Kit* (ver capítulo **8.2 Isolamento de ARN**). A taxa de erro para o SARS-CoV foi de 0 % para a totalidade das amostras. A robustez do *Controlo interno* foi verificada adicionalmente através da purificação e da análise de 30 amostras de soro negativas para o SARS-CoV. A taxa total de erro foi de 0 %. Não foram observadas inibições. Deste modo, a robustez do *artus SARS RG RT-PCR Kit* é  $\geq$  99 %.

## 11.5 Reprodutibilidade

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

## 11.6 Avaliação diagnóstica

O *artus* SARS RG RT-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 nos processos 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. Informações de segurança

As informações de segurança do *artus* SARS RG RT-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/safety](http://www.qiagen.com/safety).










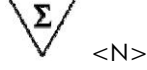

## **14. Controlo de qualidade**

De acordo com o Sistema de Administração de Qualidade certificado pelos ISO 9001 e ISO 13485 da QIAGEN, cada lote dos *artus* SARS RG RT-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
	Refêrencia de Catálogo
	Número do material
	Manual de instruções
	Produco medico diagnosticado in vitro
	Etanol
	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 SARS RG RT-PCR Kit

Marcas registradas e indicações jurídicas

QIAGEN<sup>®</sup>, QIAamp<sup>®</sup>, artus<sup>®</sup> *Rotor-Gene*<sup>®</sup> (Grupo QIAGEN; Dacron<sup>®</sup> (Invista, Inc.).

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 SARS RG RT-PCR Kit é um kit de diagnóstico sinalizado com CE de acordo com as Diretrizes Europeias 98/79/CE sobre diagnóstico in vitro. Não está disponível 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.U.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.

© 2007-2015 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

