

artus[®] HSV-1/2 LC PCR Kit

Manual de Instruções

 24 (Catálogo Nr. 4500063)

 96 (Catálogo Nr. 4500065)

Diagnóstico in vitro quantitativo

Para utilização com o equipamento *LightCycler*[®]

Versão 1



4500063, 4500065



1046888PT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden ALEMANHA

R2

MAT

1046888PT



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.

Índice

1. Conteúdo.....	4
2. Conservação	4
3. Materiais e aparelhos necessários adicionalmente	5
4. Medidas gerais de segurança	5
5. Informações acerca do agente patogénico	5
6. Princípio da PCR em Tempo Real (Real-Time PCR)	6
7. Descrição do produto	6
8. Protocolo	8
8.1 Isolamento de ADN	8
8.2 Controlo interno.....	10
8.3 Quantificação	12
8.4 Preparação da PCR	13
8.5 Programação do equipamento <i>LightCycler</i>	17
9. Análise dos dados.....	20
10. Resolução de problemas	25
11. Especificações.....	27
11.1 Sensibilidade analítica	27
11.2 Especificidade.....	28
11.3 Precisão	29
11.4 Robustez.....	32
11.5 Reprodutibilidade.....	32
11.6 Avaliação diagnóstica	32
12. Indicações especiais sobre a utilização do produto	33
13. Informações de segurança	33
14. Controlo de qualidade.....	33
15. Referência bibliográfica.....	34
16. Descrição dos símbolos	35

artus HSV-1/2 LC PCR Kit

Para utilização com o equipamento *LightCycler*.

1. Conteúdo

	Legenda e conteúdo	Nº Art. 4500063 24 reacções	Nº Art. 4500065 96 reacções
Azul	HSV LC Master	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Vermelho	HSV1 LC/RG/TM QS 1 [‡] 1 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Vermelho	HSV1 LC/RG/TM QS 2 [‡] 1 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Vermelho	HSV1 LC/RG/TM QS 3 [‡] 1 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Vermelho	HSV1 LC/RG/TM QS 4 [‡] 1 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Vermelho	HSV2 LC/RG/TM QS 1 [‡] 1 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Vermelho	HSV2 LC/RG/TM QS 2 [‡] 1 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Vermelho	HSV2 LC/RG/TM QS 3 [‡] 1 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Vermelho	HSV2 LC/RG/TM QS 4 [‡] 1 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl	1 x 200 μl
Verde	HSV LC IC [‡]	1 x 1.000 μl	2 x 1.000 μl
Branco	Water (PCR grade)	1 x 1.000 μl	1 x 1.000 μl

[‡] QS = Padrão de quantificação

IC = Controlo interno

2. Conservação

Os componentes do artus HSV-1/2 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 (>2x) 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. N°: 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

O vírus herpes simplex (VHS) é encontrado nos líquidos da vesícula herpética, na saliva e na secreção vaginal e transmitido através de contacto direto, assim como

através de relações sexuais e por via perinatal.

Na maioria das doenças provocadas pelo VHS, dominam os sintomas de vesículas na pele e nas mucosas (boca e genitais). A infecção pelo VHS pode ocorrer como infecção primária, que evolui em > 90 % dos casos de forma assintomática, ou como recidiva. Dentre as infecções primárias provocadas sobretudo pelo HSV-1, fazem parte a gengivostomatite, o eczema herpético, a queratoconjuntivite e a encefalite. Infecções primárias provocadas pelo HSV-2 podem manifestar-se como vulvovaginite, como meningite e como herpes generalizada de recém-nascidos. Como recidiva, a infecção conduz geralmente à formação de vesículas na região genital e nasolabial. As recidivas da queratoconjuntivite e da meningite são classificadas como perigosas.

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* HSV-1/2 LC PCR Kit é um sistema pronto a utilizar para a detecção de ADN do vírus herpes simplex 1 e 2 através da reacção de polimerização em cadeia (PCR) no equipamento *LightCycler*. A *HSV LC Master* contém os reagentes e enzimas para a amplificação específica de uma região de 148 pb do genoma do vírus herpes simplex, assim como para a detecção directa do material amplificado no canal de fluorescência F2 do equipamento *LightCycler*. Ao mesmo tempo, o *artus* HSV-1/2 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 HSV não é reduzido (ver capítulo **11.1 Sensibilidade analítica**). Para a determinação dos subtipos, o sistema utiliza a temperatura de dissociação específica das sondas, que geram, a 69°C para o HSV-1 e a 66°C para o HSV-2, um sinal no canal de fluorescência F2, no decorrer da curva de dissociação. Devido às diferentes condições de extracção e do uso dos diferentes tampões dela resultadas, pode haver variações de 1 a 2°C que, entretanto, se referem igualmente aos amplificadores do HSV-1 e do HSV-2. São fornecidos controlos positivos externos (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4* & *HSV2 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 vírus herpes simplex com ajuda do *artus HSV-1/2 LC PCR Kit* corresponde aos do *artus EBV 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 **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), raspagem	QIAamp® UltraSens	53 704	QIAGEN	contém
	QIAamp® DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	não contém
LCR (líquido cefaloraquidiano)	EZ1® DSP Virus Kit (48)*	62 724	QIAGEN	contém

*Para ser usado em combinação com o BioRobot® 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 extracção dos ácidos nucleicos de líquidos biológicos sem células ou de materiais com pequena quantidade de ADN/ARN (p. ex. líquido céfalo-raquidiano). Por favor, siga as seguintes instruções:

- 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) 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°C . Evite a repetida descongelação ($> 2 \times$) de uma alíquota de Carrier-ARN.

- Por purificação deve ser adicionado 1 μg de Carrier-ARN por 100 μl de

tampão de lise. Se o protocolo de extracção prevê por exemplo 200 μl de tampão de lise por amostra purificada, então adicione 2 μl 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 μl	p. ex. 2.400 μl
Carrier-ARN (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2 μl	24 μl
Volume Total	202 μl	2.424 μl
Volume para a purificação	200 μl	cada 200 μl

- 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:
 - a. Antes da primeira utilização do kit de isolamento, ressuspenda o Carrier-ARN liofilizado em 310 μl 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°C . Evite a repetida descongelação (> 2 x) 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 **8.2 Controlo interno**) de acordo com o seguinte esquema de pipetagem.

Número de amostras	1	12
Tampão de lise AC	800 μ l	9.600 μ l
Carrier-ARN (1 μ g/ μ l)	5,6 μ l	67,2 μ l
Volume Total	805,6 μl	9.667,2 μl
Volume para a purificação	800 μl	cada 800 μl

- 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.
 - 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* HSV-1/2 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* HSV-1/2 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 (HSV 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 Virus**

Kit 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 μl de *Controlo interno* directamente a 15 μl de HSV LC Master. Utilize para cada reacção de PCR 15 μl da Master Mix* desta forma produzida e adicione, em seguida, 5 μl de amostra purificada. Se tiver que preparar um ensaio com várias amostras, então aumente as quantidades necessárias de HSV LC Master e de *Controlo interno* proporcionalmente ao número de amostras (ver capítulo **8.4 Preparação da PCR**).

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

* 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.

8.3 Quantificação

Os Padrões de quantificação fornecidos (HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4) são tratados como uma amostra purificada e utilizados no mesmo volume (5 μ l). Para criar uma curva padrão no equipamento *LightCycler*, utilize, tanto para o HSV-1 quanto para o HSV-2, 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 deve ser levado em consideração que, devido à variabilidade entre os ensaios da 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 *quantifica*o, separadamente.

Atenção: Os Padrões de *quantifica*o são definidos em cópias/ μ 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 a simplificação da avaliação quantitativa de sistemas *artus* no equipamento *LightCycler* existe em 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 (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4* & *HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4*), 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 (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4* & *HSV2 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 previamente na fase de 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>HSV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>HSV LC IC</i>	0 µl	0 µl
	Volume Total	15 µl	180 µl
2. Preparação da Reacção de PCR	Master Mix	15 µl	cada 15 µl
	Amostra	5 µl	cada 5 µl
	Volume Total	20 µl	cada 20 µl

Se desejar utilizar o *Controlo interno exclusivamente para o controlo de uma inibição da PCR*, então adicione-o directamente à HSV 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	HSV LC Master	15 μ l	180 μ l
	HSV LC IC	0,5 μ l	6 μ l
	Volume Total	15,5 μl*	186 μl*
2. Preparação da Reacção de PCR	Master Mix	15 μ l*	cada 15 μ l*
	Amostra	5 μ l	cada 5 μ l
	Volume Total	20 μl	cada 20 μl

Pipete para o reservatório de plástico de cada capilar 15 μ l da Master Mix. Em seguida, adicione 5 μ l de eluído do isolamento de ADN. De forma correspondente, devem ser colocados, como controlo positivo, 5 μ l de pelo menos um dos Padrões de quantificação (HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4 & HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4) e, como controlo negativo, 5 μ 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

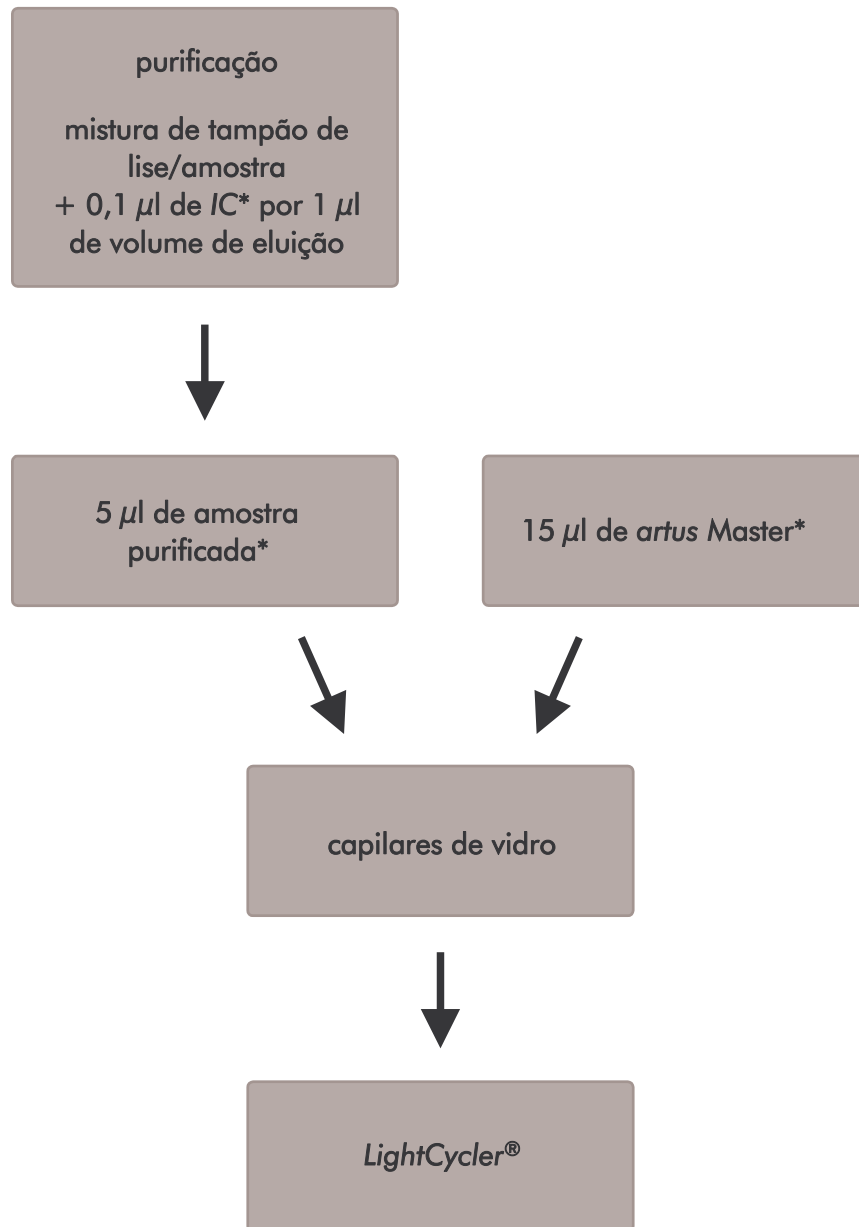


Fig. 1: Fluxo esquemático da operação para o controlo da purificação e da inibição da PCR.

* 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

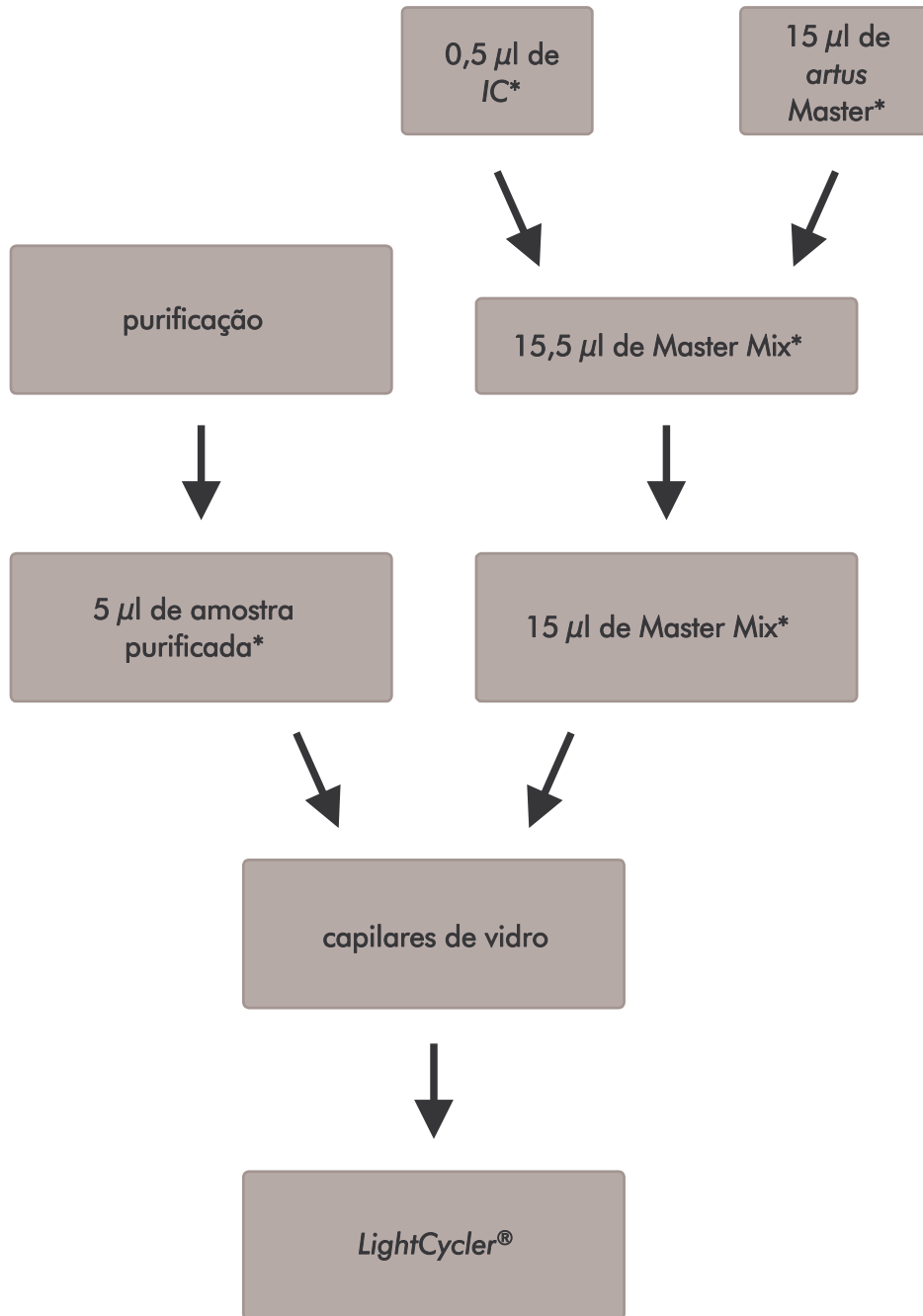


Fig. 2: Fluxo esquemático da operação para o controlo da inibição da PCR.

* 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 vírus herpes simplex 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 Touch Down | Fig. 4 |
| C. | Amplificação do ADN | Fig. 5 |
| D. | Curva de dissociação | 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*.

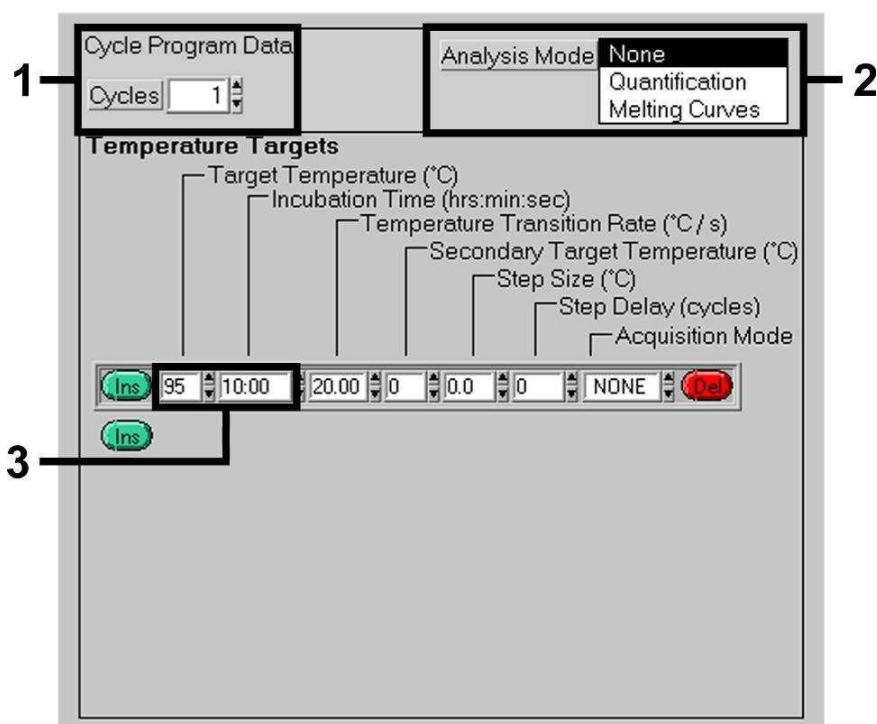


Fig. 3: Activação inicial da enzima Hot Start.

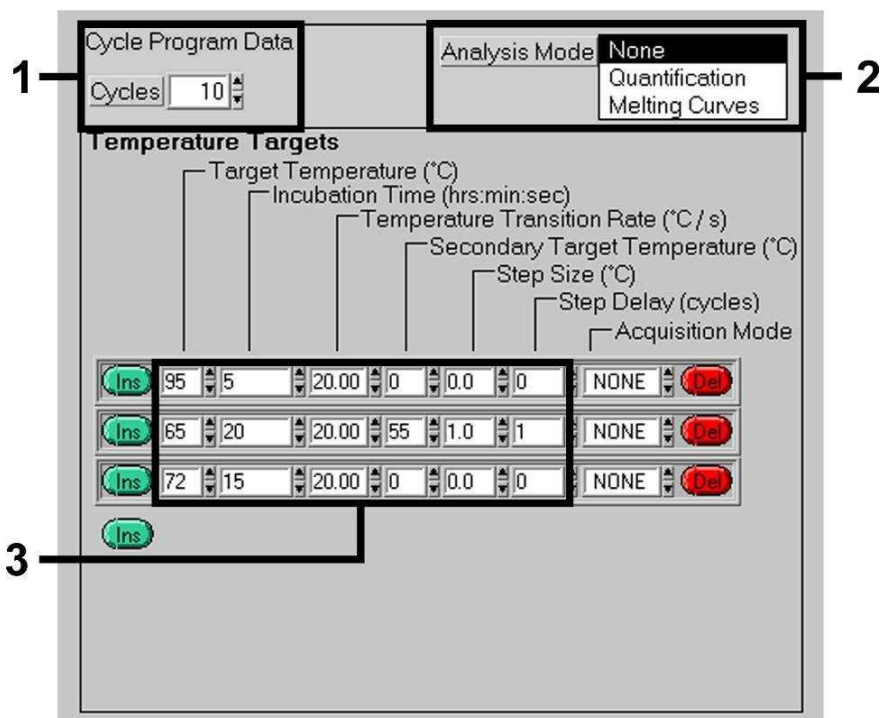


Fig. 4: Passo Touch Down.

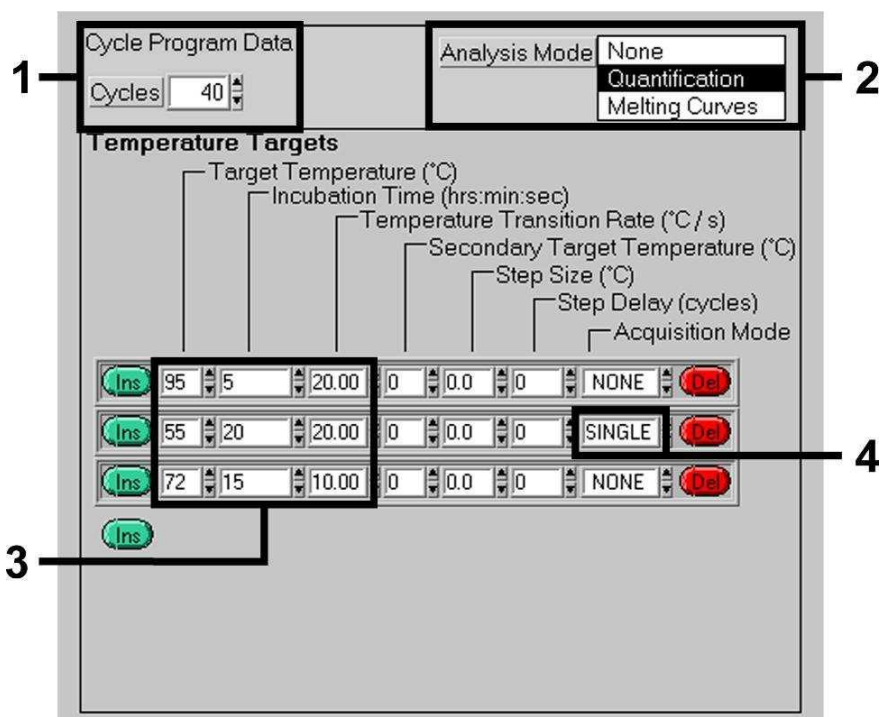


Fig. 5: Amplificação do ADN.

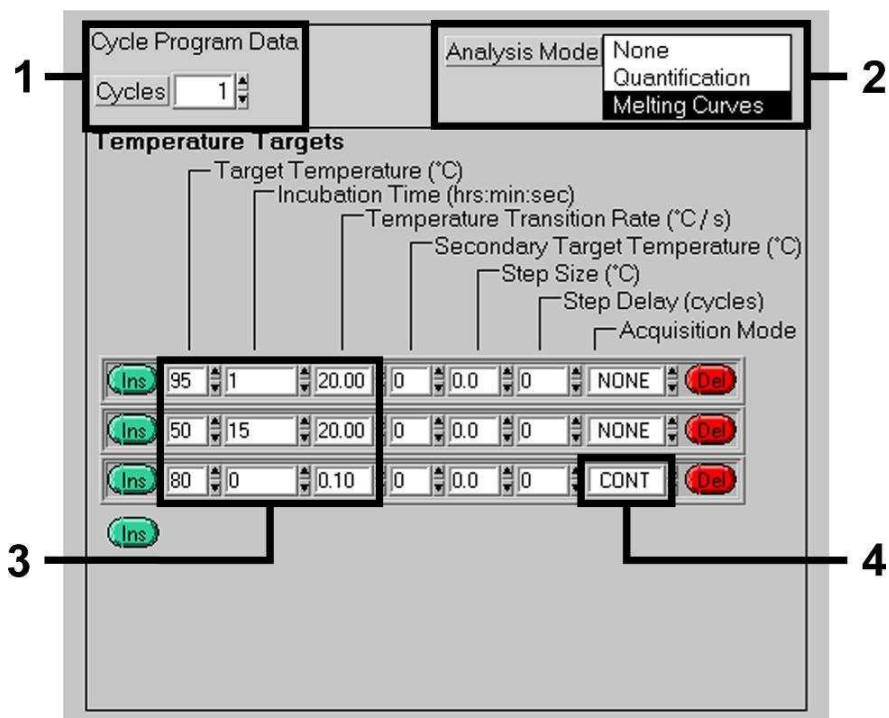


Fig. 6: Curva de dissociação.

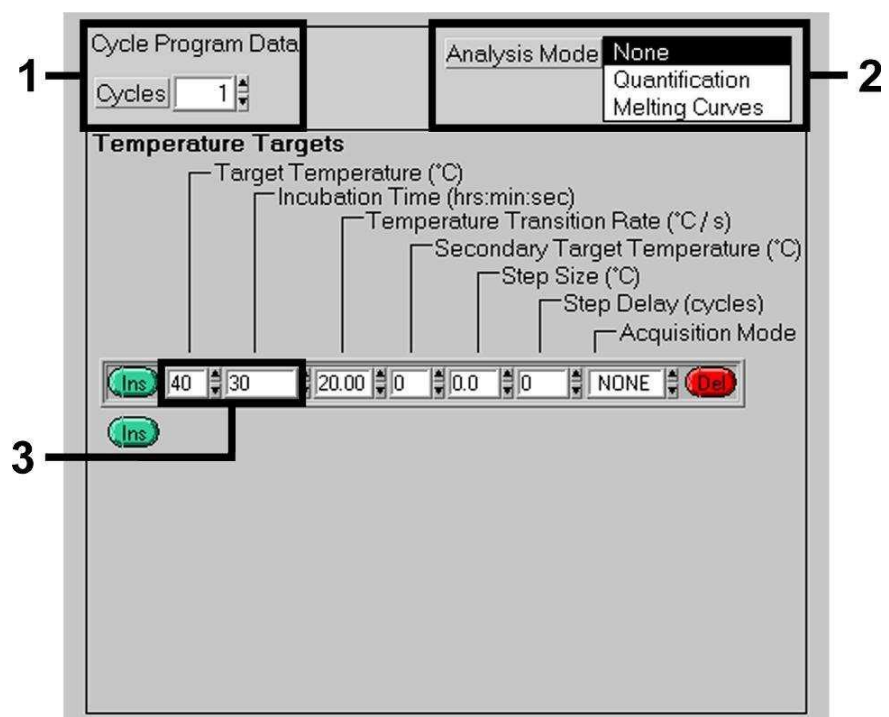


Fig. 7: Refrigeração.

9. Análise dos dados

Nas análises multi-canal, 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 HSV-1/2 LC PCR Kit*, seleccione as funções de perspectiva F2/Back-F1 para a PCR analítica do HSV 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 à **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.

Caso tenha sido integrado mais do que um sistema *Herpes-artus* no seu ensaio de PCR, então certifique-se de que as amostras de VHS e as respectivas curvas padrão sejam analisadas separadamente de todos os outros sistemas. Nisto, ter em atenção que as amostras do VHS-1 devem ser analisadas com a curva padrão dos respectivos padrões do VHS-1 (*HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4*) e as amostras do VHS-2 com a curva padrão dos respectivos padrões do VHS-2 (*HSV2 LC/RG/TM QS 1 – 4*).

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 VHS.

Neste caso, a detecção de um sinal no canal F3/Back-F1 é secundária, pois elevadas concentrações iniciais de ADN do VHS (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).

A diferença pode ser feita com base no ponto de dissociação (canal F2/Back-F1, programa *Melting Curve*), a 69°C para os amplificadores do VHS-1 e a 66°C para os amplificadores do VHS-2. Devido às diferentes condições de extração e do uso dos dela resultada diferentes tampões, pode haver variações de 1 a 2°C que, entretanto, se referem igualmente aos amplificadores do VHS-1 e do VHS-2.

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 VHS, por isso ela pode ser considerada negativa.

No caso de PCR negativa do HSV, 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, assim como de uma análise da curva de dissociação, estão reproduzidos nas Fig. 8 a 12.

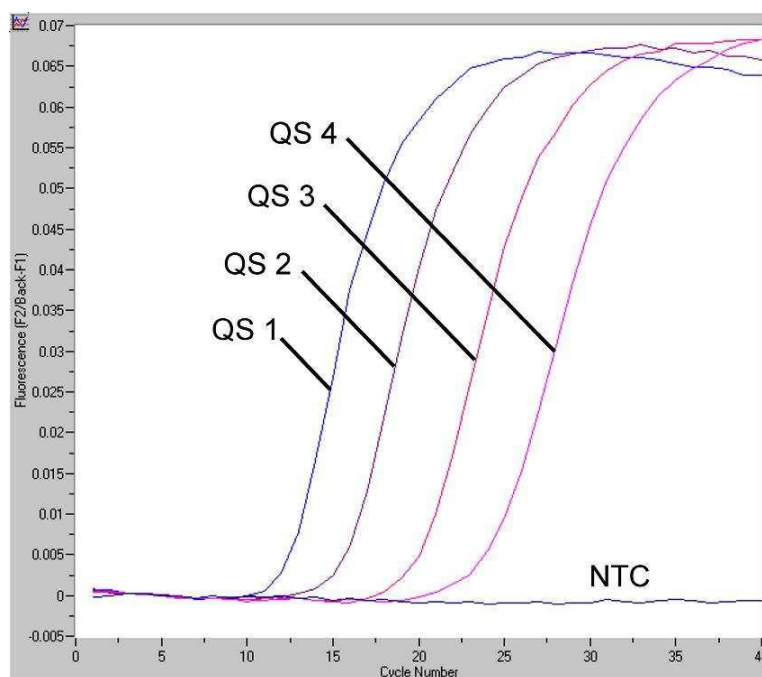


Fig. 8: Detecção dos Padrões de quantificação (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4) no canal de fluorescência F2/Back-F1. NTC: non-template control (controlo negativo).

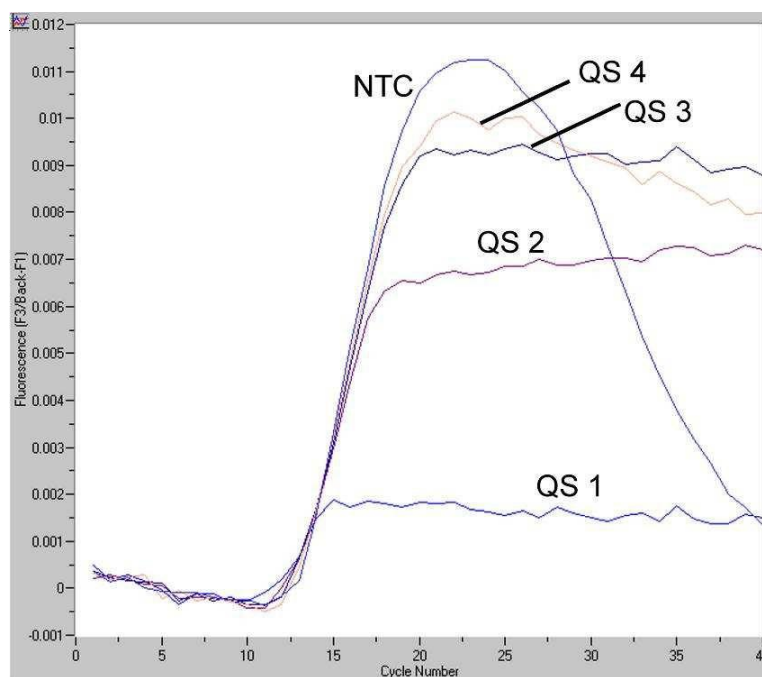


Fig. 9: Detecção do Controlo interno (IC) no canal de fluorescência F3/Back-F1 no caso de amplificação simultânea dos Padrões de quantificação (HSV1 LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (controlo negativo).

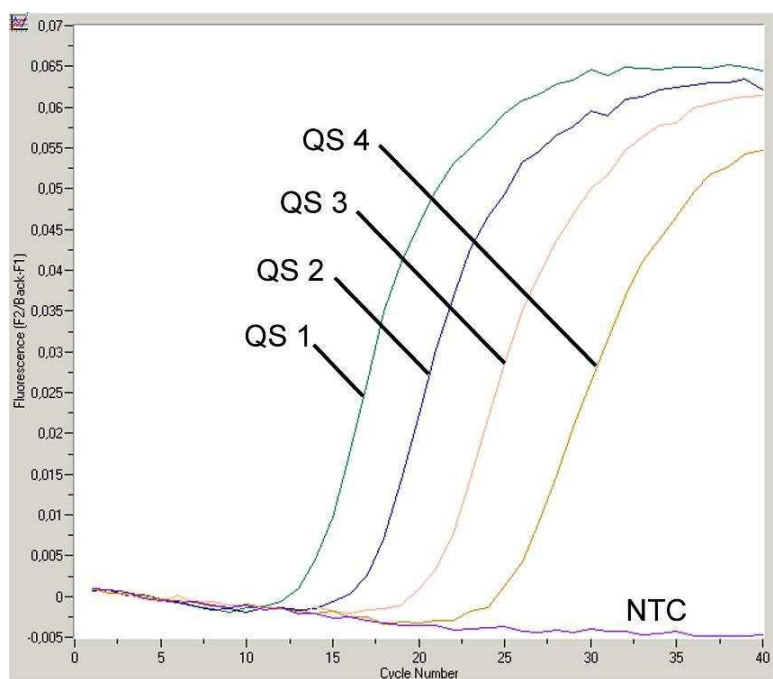


Fig. 10: Detecção dos Padrões de quantificação (**HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4**) no canal de fluorescência F2/Back-F1. NTC: non-template control (controlo negativo).

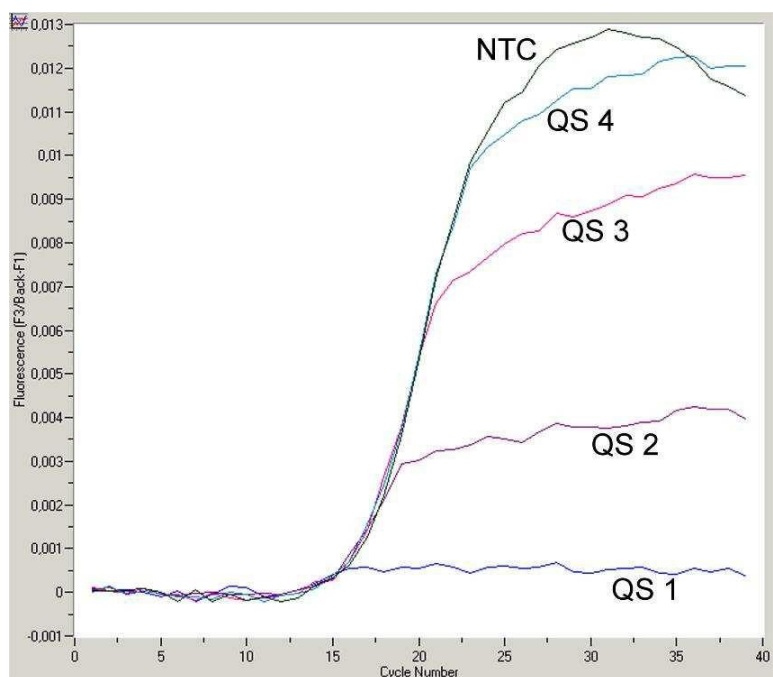


Fig. 11: Detecção do *Controlo interno* (IC) no canal de fluorescência F3/Back-F1 no caso de amplificação simultânea dos Padrões de quantificação (**HSV2 LC/RG/TM QS 1 - 4**). NTC: non-template control (controlo negativo).

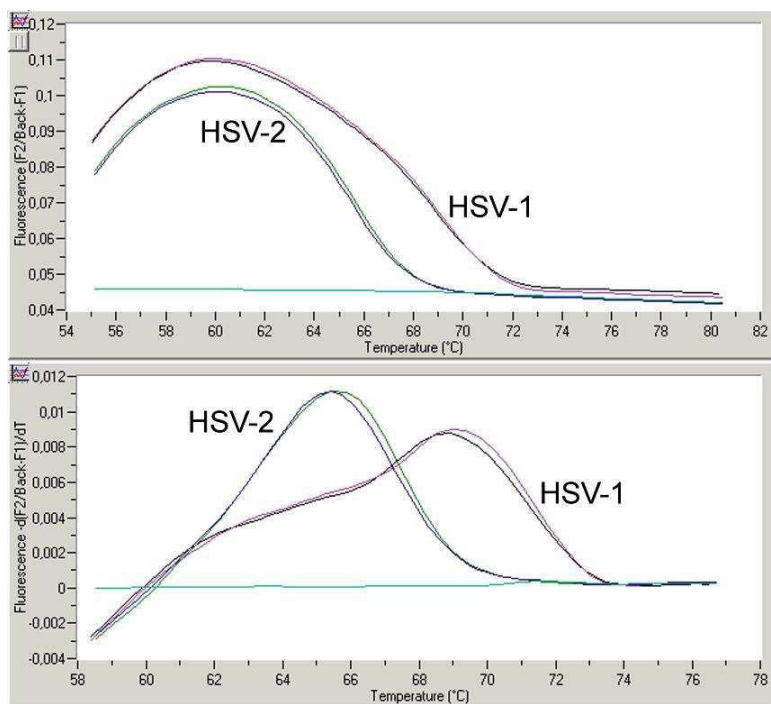


Fig. 12: Diferença entre HSV-1 e HSV-2 no canal de fluorescência F2/Back-F1 (programa Melting Curve).

10. Resolução de problemas

Ausência de sinal no canal de fluorescência F2/Back-F1 nos controlos positivos (HSV1 LC/RG/TM QS 1 – 4 & HSV2 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 F2/Back-F1 para a PCR analítica do VHS 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 HSV-1/2 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 novo kit.

Sinal do *Controlo interno* enfraquecido ou até mesmo a ausência do mesmo no canal de fluorescência F3/Back-F1, em caso de ausência simultânea 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 de 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 HSV-1/2 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 novo kit.

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* HSV-1/2 LC PCR Kit foi criada uma série de diluições padrão de 31,6 a aproximadamente 0,01 equivalentes de cópias do VHS-1 ou do VHS-2*/ μl e esta foi analisada com o *artus* HSV-1/2 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 nas Fig. 13 e Fig. 14. O limite de detecção ($p = 0,05$) do *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit está, desta forma, estabelecido em 1 cópia/ μl , tanto para o VHS-1 quanto para o VHS-2. Isto significa que existe uma probabilidade de 95 % de ser detectada 1 cópia/ μl .

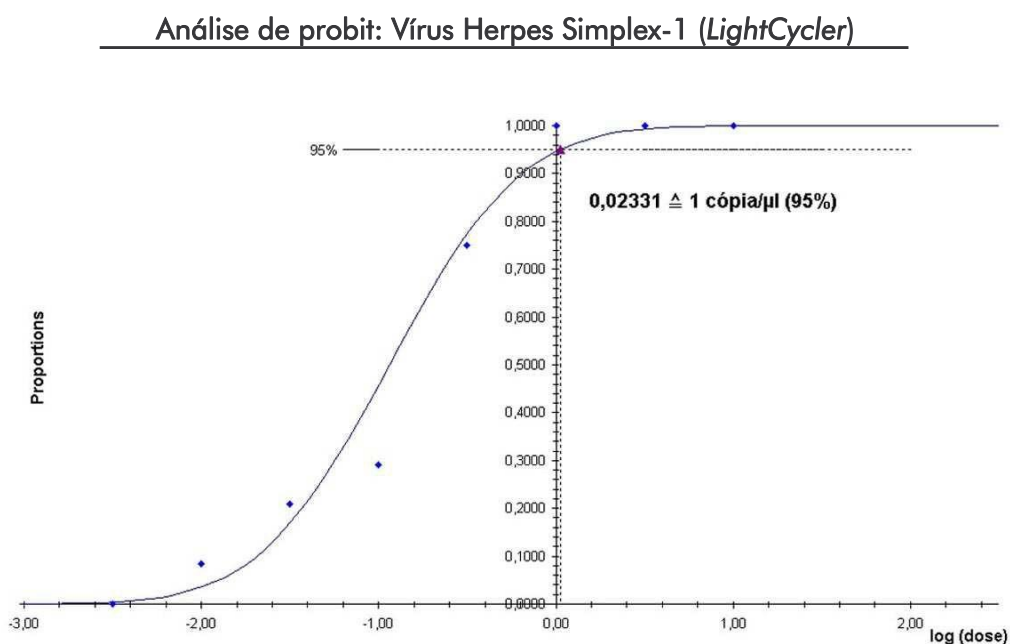


Fig. 13: Sensibilidade analítica do *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit (VHS-1).

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

Análise de probit: Vírus Herpes Simplex-2 (LightCycler)

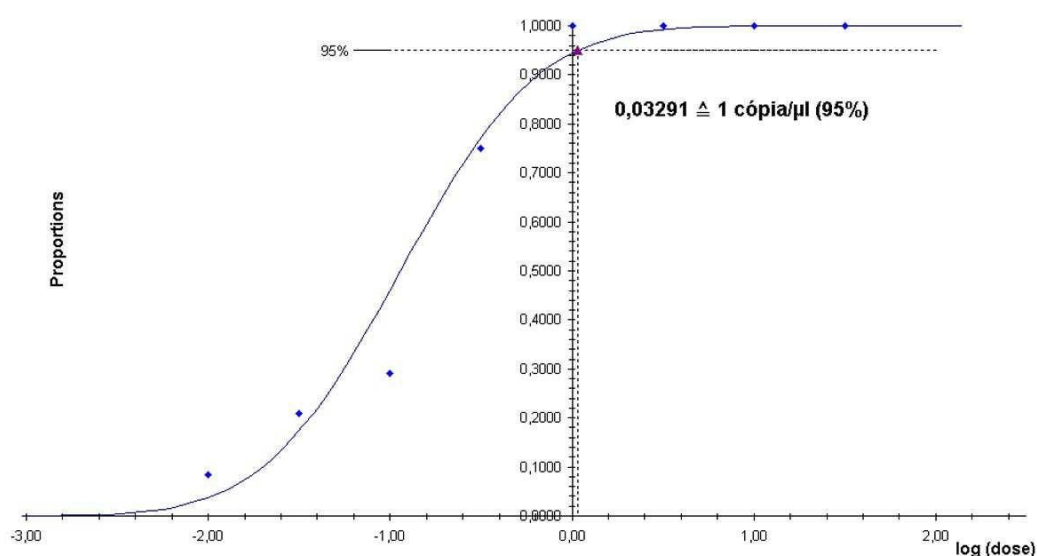


Fig. 14: Sensibilidade analítica do *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit (VHS-2).

11.2 Especificidade

A especificidade do *artus* HSV-1/2 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 tipos de herpes relevantes.

Adicionalmente, a validação da especificidade foi realizada com 30 diferentes amostras de líquido céfalo-raquidiano (LCR) negativas para o HSV, que não geraram sinal com os iniciadores (primers) e sondas específicas para o HSV contidos na HSV LC Master.

Para a determinação da especificidade do *artus* HSV-1/2 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	HSV-1/2 (F2/Back-F1)	Controlo interno (F3/Back-F1)
Vírus do herpes humano 3 (vírus Varicela-Zoster)	-	+
Vírus do herpes humano 4 (vírus Epstein-Barr)	-	+
Vírus do herpes humano 5 (Citomegalovírus)	-	+
Vírus do herpes humano 6 A	-	+
Vírus do herpes humano 6 B	-	+
Vírus do herpes humano 7	-	+
Vírus do herpes humano 8 (vírus herpes associado ao sarcoma de Kaposi)	-	+

11.3 Precisão

Os dados de precisão para o *artus* HSV-1/2 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 o sistema específico como também para o sistema de *Controlo interno*.

Estes dados foram apurados para o *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit com base no Padrão de quantificação com a menor concentração (QS 4; 10 cópias/ μ 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/Tabela 4) e nos valores quantitativos em cópias/ μ l (ver Tabela 3/Tabela 5). De acordo com estes resultados, a flutuação estatística de uma amostra qualquer com a concentração determinada é de 1,67 % (Ct, VHS-1) e 1,95 % (Ct, VHS-2), ou seja, 20,66 % (concentração, VHS-1) e 22,42 % (concentração, VHS-2) e, para a detecção do *Controlo interno*, é de 1,23 % (Ct, VHS-1) ou 1,04 % (Ct, VHS-2).

Estes valores baseiam-se na totalidade de cada um dos valores apurados nas variabilidades.

Tabela 2: Dados de precisão para o VHS-1 com base no valor Ct.

	Desvio Padrão	Variância	Coefficiente de variação [%]
Variabilidade Intra-Ensaio: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,27	0,07	1,13
Variabilidade Intra-Ensaio: <i>Controlo interno</i>	0,03	0,00	0,23
Variabilidade Inter-Ensaio: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,39	0,15	1,66
Variabilidade Inter-Ensaio: <i>Controlo interno</i>	0,12	0,01	0,99
Variabilidade Inter-Lote: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,41	0,17	1,72
Variabilidade Inter-Lote: <i>Controlo interno</i>	0,17	0,03	1,40
Variância Total: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	0,39	0,15	1,67
Variância Total: <i>Controlo interno</i>	0,15	0,02	1,23

Tabela 3: Dados de precisão para o VHS-1 com base nos valores quantitativos (em cópias/ μ l).

	Desvio Padrão	Variância	Coefficiente de variação [%]
Variabilidade Intra-Ensaio: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	1,76	3,08	17,34
Variabilidade Inter-Ensaio: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	2,02	4,08	19,82
Variabilidade Inter-Lote: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	2,37	5,64	23,10
Variância Total: <i>HSV1 LC/RG/TM QS 4</i>	2,11	4,46	20,66

Tabela 4: Dados de precisão para o VHS-2 com base no valor Ct.

	Desvio Padrão	Variância	Coefficiente de variação [%]
Variabilidade Intra-Ensaio: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,22	0,05	0,90
Variabilidade Intra-Ensaio: <i>Controlo interno</i>	0,04	0,00	0,33
Variabilidade Inter-Ensaio: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,62	0,38	2,51
Variabilidade Inter-Ensaio: <i>Controlo interno</i>	0,12	0,01	0,98
Variabilidade Inter-Lote: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,38	0,14	1,52
Variabilidade Inter-Lote: <i>Controlo interno</i>	0,14	0,02	1,12
Variância Total: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	0,48	0,23	1,95
Variância Total: <i>Controlo interno</i>	0,13	0,02	1,04

Tabela 5: Dados de precisão para o VHS-2 com base nos valores quantitativos (em cópias/ μ l).

	Desvio Padrão	Variância	Coefficiente de variação [%]
Variabilidade Intra-Ensaio: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,39	1,94	13,82
Variabilidade Inter-Ensaio: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	2,86	8,20	27,46
Variabilidade Inter-Lote: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	1,96	3,85	19,27
Variância Total: <i>HSV2 LC/RG/TM QS 4</i>	2,30	5,31	22,42

11.4 Robustez

A verificação da robustez serve para apurar a taxa total de erro do *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit. Para isso, foram misturadas 30 amostras de líquido céfalo-raquidiano (LCR) negativas para o VHS, com 3 cópias/ μ l por volume de eluição de ADN de controlo de VHS-1 (três vezes a concentração dos limites de sensibilidade analíticos). As amostras foram purificadas com o QIAamp DNA Mini Kit e analisadas com o *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit (ver capítulo 8.1 **Isolamento de ADN**). Do mesmo modo, foi feita a análise para o VHS-2 (30 amostras de líquido céfalo-raquidiano (LCR); 3 cópias/ μ l ADN de controlo do VHS-2). A taxa de erro tanto para o VHS-1 quanto para o VHS-2 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 líquido cefaloraquidiano (LCR) negativas para o VHS. A taxa total de erro foi de 0 %. Não foram observadas inibições. Deste modo, a robustez do *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit é ≥ 99 %.

11.5 Reprodutibilidade

Os dados da reprodutibilidade permitem avaliar regularmente o desempenho do *artus* HSV-1/2 LC PCR Kit, assim como para compará-lo com o desempenho de outros produtos, através da participação em testes interlaboratoriais.

11.6 Avaliação diagnóstica

O *artus* HSV-1/2 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 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* HSV-1/2 LC PCR Kit podem ser obtidas nas Páginas 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.










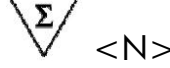

14. Controlo de qualidade

De acordo com o Sistema de Administração de Qualidade certificado pelos ISO 9001 e ISO 13485 da QIAGEN, cada lote dos *artus* HSV-1/2 LC PCR Kits foi testado de acordo com as especificações anteriormente apresentadas a fim de garantir a qualidade do produto.

15. Referência bibliográfica

- (1) Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 - 212.
- (2) Whiley DM, Syrmis MW, Mackay IM, Sloots TP. Preliminary comparison of three *LightCycler* PCR assays for the detection of Herpes Simplex virus in swab specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22: 764 - 767.

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
	Etanol
	Número do item de comércio mundial
	Conteúdo é suficiente para <N> testes
	Limites de Temperatura
QS	<i>Padrão de quantificação</i>
IC	<i>Controlo interno</i>

artus HSV-1/2 LC PCR Kit

Marcas registradas e indicações jurídicas

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

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* HSV-1/2 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.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

