



Manual *artus*[®] HSV-1/2 RG PCR Kit

 24 (ref.º 4500263)
 96 (ref.º 4500265)

Versão 1



Diagnóstico qualitativo in vitro

Para usar com os instrumentos Rotor-Gene[®] Q



4500263, 4500265



1060171PT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R2

 MAT

1060171PT



Tecnologias de amostragem e ensaio da QIAGEN

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 obter mais informações, visite www.qiagen.com.

Índice

Conteúdo do kit	4
Símbolos	4
Armazenamento	5
Utilização prevista	5
Limitações de utilização do produto	6
Assistência técnica	6
Controlo da qualidade	6
Avisos e precauções	7
Introdução	8
Princípio	8
Informações sobre os patógenos	8
Características de desempenho	9
Sensibilidade analítica	9
Especificidade	10
Precisão	13
Robustez	16
Reprodutibilidade	16
Equipamento e reagentes a serem fornecidos pelo utilizador	17
Notas importantes	18
Precauções gerais	18
Isolamento de ADN	18
Controlo interno	19
Protocolo: PCR e análise de dados	20
<i>i</i> Aspectos importantes antes do início do procedimento	20
Outros aspectos importantes antes de iniciar o procedimento	20
Procedimento	20
Guia de resolução de problemas	31
Referências	34
Informações para encomenda	35

Conteúdo do kit

artus HSV-1/2 RG PCR Kit		(24)	(96)
Ref.º		4500263	4500265
Número de reacções		24	96
Azul	HSV-1/2 RG Master	2 x 300 µl	8 x 300 µl
Amarela	HSV-1/2 RG Mg-Sol* Mg-Sol	600 µl	600 µl
Vermelha	HSV-1 RG PC† (100 cóp./µl)	200 µl	200 µl
Castanha	HSV-2 RG PC† (100 cóp./µl)	200 µl	200 µl
Verde	HSV-1/2 RG IC‡ IC	1000 µl	2 x 1000 µl
Branca	Água (grau PCR)	1000 µl	1000 µl
	Manual 	1	1

* Solução de magnésio.

† Controlo positivo.

‡ Controlo interno.

Símbolos



<N>

Contém reagentes para <N> testes



Para utilização até



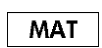
Dispositivo médico para diagnóstico in vitro



Ref.º



Número de lote



Número do material



Componentes



Contém



Número



Número do item de comércio mundial



Limitação de temperatura



Fabricante legal



Consulte as informações dadas no manual



Nota importante

Armazenamento

Os componentes do kit *artus* HSV-1/2 RG PCR devem ser armazenados entre –15 e –30 °C e são estáveis até ao prazo de validade impresso no rótulo.

Devem ser evitados ciclos repetidos de congelamento e descongelamento (> 2 x), dado que tal pode reduzir a sensibilidade do ensaio. Se os reagentes se destinarem a ser usados apenas de forma intermitente, devem ser congelados em alíquotas. O armazenamento a 2-8°C não pode exceder um período de 5 horas.

Utilização prevista

O kit *artus* HSV-1/2 RG PCR é uma reacção em cadeia da polimerase (PCR) com base em tempo real para a detecção e a discriminação de ADN do vírus do herpes humano simples 1 e 2 nos instrumentos Rotor-Gene Q, depois da purificação totalmente automatizada de amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de indivíduos infectados com HSV usando o kit EZ1[®] DSP Virus.



O kit *artus* HSV-1/2 RG PCR não pode ser usado com instrumentos Rotor-Gene Q 2plex.

O kit *artus* HSV-1/2 RG PCR destina-se a ser usado juntamente com apresentação clínica e outros marcadores de laboratório para prognóstico de doença.

Limitações de utilização do produto

Todos os reagentes têm de ser usados exclusivamente em diagnósticos in vitro.

O produto destina-se a ser usado apenas por pessoal especialmente instruído e formado nos procedimentos de diagnóstico in vitro (EN 375).

O manual do utilizador tem de ser estritamente observado para os melhores resultados de PCR.

Atenção aos prazos de validade impressos na caixa e nos rótulos de todos os componentes. Não utilize componentes cujo prazo tenha expirado.

Assistência técnica

Na QIAGEN, orgulhamo-nos da qualidade e da disponibilidade do nosso suporte técnico. Os nossos departamentos de assistência técnica são compostos por cientistas experientes com conhecimentos práticos e teóricos abrangentes em tecnologias de amostragem e ensaio e utilização dos produtos QIAGEN®. Se tiver alguma dúvida ou dificuldades em relação ao kit *artus* HSV-1/2 RG PCR ou aos produtos QIAGEN em geral, não hesite em contactar-nos.

Os clientes da QIAGEN são a principal fonte de informação no que diz respeito às utilizações avançadas ou especializadas dos nossos produtos. Estas informações são úteis a outros cientistas, bem como aos investigadores da QIAGEN. Por conseguinte, incentivamo-lo a contactar-nos caso tenha alguma sugestão acerca do desempenho dos produtos ou de novas aplicações e técnicas.

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Suporte Técnico em www.qiagen.com/Support ou contacte um dos Departamentos da Assistência Técnica ou distribuidores locais da QIAGEN (consulte o verso do manual ou visite www.qiagen.com).

Controlo da qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade Total certificado por norma ISO da QIAGEN, todos os lotes do kit *artus* HSV-1/2 RG PCR são testados face a especificações predeterminadas para garantir uma qualidade constante do produto.

Avisos e precauções

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para obter mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (SDS) adequadas. Estas estão disponíveis online no formato PDF, prático e compacto, no endereço www.qiagen.com/safety onde poderá encontrar, visualizar e imprimir as SDSs para cada kit da QIAGEN® e respectivos componentes.

Elimine os resíduos de amostras e ensaios conforme os regulamentos de segurança locais.

Introdução

O kit *artus* HSV-1/2 RG PCR é um sistema pronto a utilizar para a detecção de ADN de HSV-1 e HSV-2 usando uma reacção em cadeia da polimerase (PCR) em instrumentos Rotor-Gene Q. O HSV-1/2 RG Master contém reagentes e enzimas para a amplificação específica de uma região 154 bp dos genomas HSV-1 e HSV-2, e para a detecção directa do amplicon específico no canal de fluorescência Cycling Green (fonte 470 nm, detector 510 nm) e Cycling Orange (fonte 585 nm, detector 610 nm) dos instrumentos Rotor-Gene Q.

Para além disso, o kit *artus* HSV-1/2 RG PCR contém um segundo sistema de amplificação heterólogo para identificar uma possível inibição da PCR. Isto é detectado como um controlo interno (IC) no canal de fluorescência Cycling Yellow (fonte 530 nm, detector 555 nm) dos instrumentos Rotor-Gene Q. O limite de detecção do HSV-1/2 RG PCR analítico (ver "Sensibilidade analítica", pág. 9) não é reduzido. São fornecidos controlos externos positivos (HSV-1 RG PC e HSV-2 RG PC).

Princípio

A detecção de patógenos através da reacção em cadeia da polimerase (PCR) baseia-se na amplificação de regiões específicas do genoma do patógeno. Em PCR em tempo real, o produto amplificado é detectado pelos corantes fluorescentes. Estes estão normalmente ligados a sondas de oligonucleotídeos que se ligam, especificamente, ao produto amplificado. A monitorização das intensidades de fluorescência durante a corrida de PCR (ou seja, em tempo real) permite a detecção e a quantificação do produto de acumulação sem ser preciso voltar a abrir os tubos de reacção depois da corrida de PCR.*

Informações sobre os patógenos

O vírus do herpes simples (HSV) encontra-se em fluidos de lesão, saliva, líquido cefalorraquidiano (LCR) e secreções vaginais. A forma primária de transmissão é através de contacto directo com lesões e por meio de relações sexuais, bem como no período perinatal. Lesões na pele e nas mucosas da boca e dos genitais caracterizam a maior parte dos casos positivos de HSV. A infecção HSV tanto pode ser primária (> 90 % destes casos são assintomáticos), como recorrente (secundária). A infecção primária com HSV-1 pode causar, entre outras coisas, gengivostomatite, eczema herpético, ceratoconjuntivite e encefalite; a infecção primária HSV-2 ocorre como, entre outras coisas, vulvovaginite, meningite e herpes generalizada em recém-nascidos. Os

* Mackay, I.M. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. **10**, 190.

sintomas primários de uma infecção secundária são lesões cutâneas no nariz, na boca e nas regiões genitais.. Ainda mais graves são as formas recorrentes de ceratoconjuntivite e de meningite.

Características de desempenho

Sensibilidade analítica

Para determinar a sensibilidade analítica do kit *artus* HSV-1/2 RG PCR, foi definida uma série de diluição padrão entre 10 e 0,001 cópias/ μ l e analisada no Rotor-Gene Q/6000 juntamente com o kit *artus* HSV-1/2 RG PCR. O teste foi realizado em 3 dias diferentes em 8 replicações. Os resultados foram determinados por uma análise probit. O limite de detecção analítica do kit *artus* HSV-1/2 RG PCR juntamente com o Rotor-Gene Q/6000 é, de uma forma consistente, 0,12 cópias/ μ l ($p = 0,05$) para HSV-1 e 0,16 cópias/ μ l ($p=0,05$) para HSV-2. Isto significa que há uma probabilidade de 95 % de serem detectadas 0,12 cópias/ μ l de ADN de HSV-1 ou 0,16 cópias/ μ l de ADN de HSV-2. Na fig. 1 abaixo, encontra-se uma ilustração gráfica da análise probit para HSV-1; o diagrama da análise probit para HSV-2 é mostrado na Fig. 2

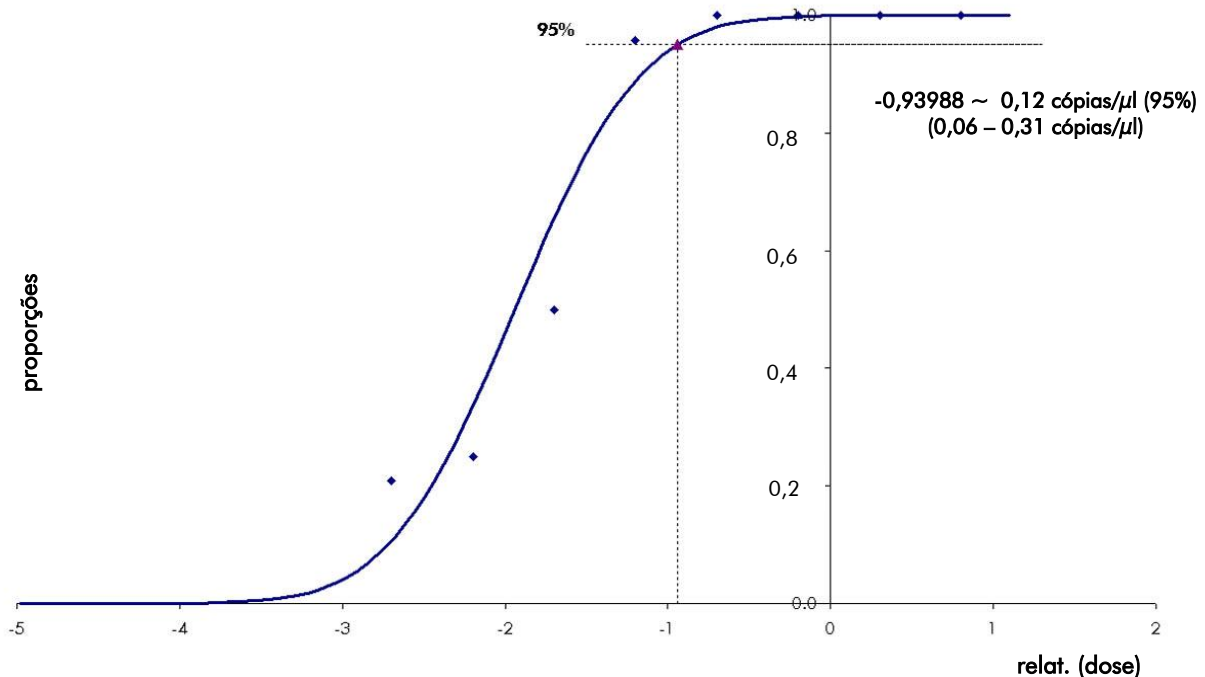


Fig. 1. Análise probit: HSV-1 (Rotor-Gene Q/6000). Sensibilidade analítica para HSV-1 do kit *artus* HSV-1/2 RG PCR no Rotor-GeneQ/ 6000.

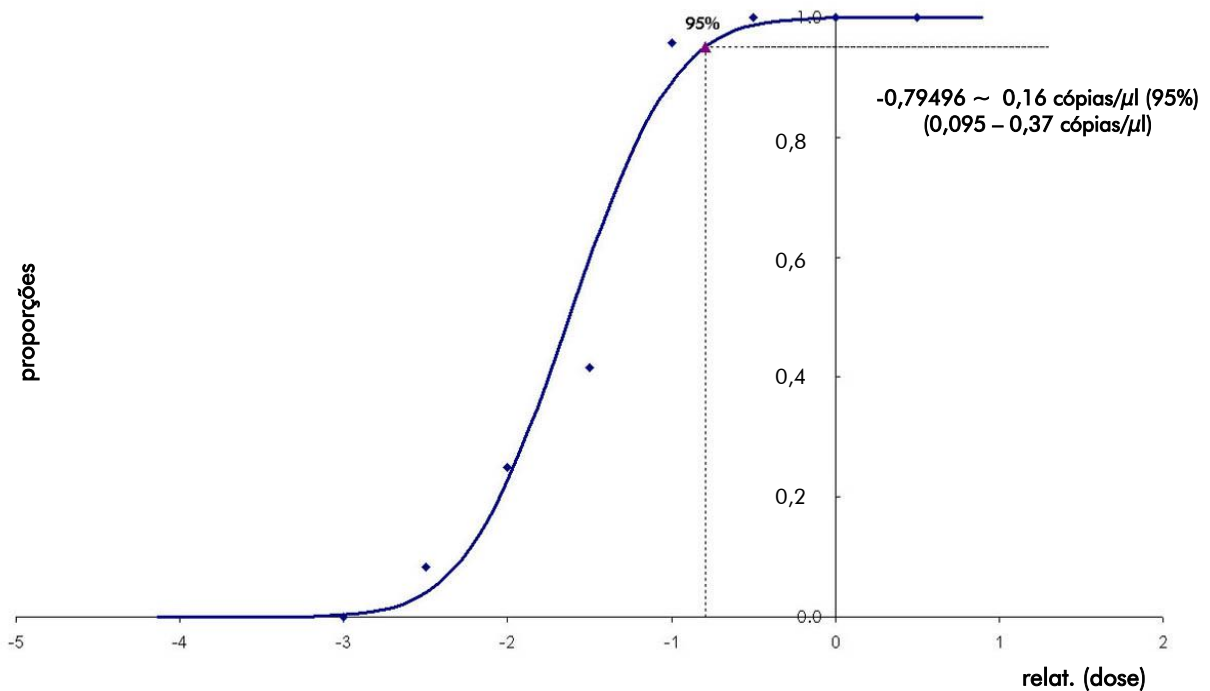


Fig. 2. Análise probit: HSV-2 (Rotor-Gene Q/6000). Sensibilidade analítica para HSV-2 do kit *artus* HSV-1/2 RG PCR no Rotor-Gene Q/6000.

Especificidade

A especificidade do kit *artus* HSV-1/2 PCR é assegurada, primeiramente e sobretudo, pela selecção dos iniciadores (primers) e das sondas, bem como pela selecção das condições da reacção severa. Os iniciadores (primers) e as sondas foram verificados quanto a possíveis homologias com todas as sequências depositadas em bancos de genes por análise comparativa de sequências. Contudo, a detectabilidade de todos os genotipos relevantes foi assegurada por um alinhamento da base de dados e por uma corrida de PCR nos instrumentos Rotor-Gene com as estirpes listadas na tabela 1.

Além disso, a especificidade foi validada com 30 amostras de LCR distintas negativas para HSV-1 e HSV-2. Estes não criaram sinais com os iniciadores (primers) e as sondas específicos de HSV-1 e HSV-2, incluídos no HSV-1/2 RG Master.

Foi testada uma potencial reactividade cruzada do kit *artus* HSV-1/2 RG PCR usando o grupo de controlo listado na tabela 2. Nenhum dos patógenos testados foi reactivo.

Tabela 1. Teste da especificidade dos genótipos relevantes

Vírus	Estirpe	Fonte	HSV-1 (Cycling Green)	HSV-2 (Cycling Orange)	Controlo interno (Cycling Yellow)
HSV-1	HF	ATCC*	+	–	+
HSV-1	KOS	INSTAND†	+	–	+
HSV-1	MacIntyre	QCMD‡	+	–	+
HSV-2	HG-52	NCPV§	–	+	+
HSV-2	G	ATCC*	–	+	+
HSV-2	MS	QCMD‡	–	+	+

* ATCC American Type Culture Collection (Colecção de Culturas de Tipo Americano).

† INSTAND Society for Promotion of Quality Assurance in the Medical Laboratories (Sociedade para a Promoção da Garantia da Qualidade nos Laboratórios Médicos).

‡ QCMD Quality Control for Molecular Diagnostics (Controlo da Qualidade para o Diagnóstico Molecular).

§ NCPV National Collection of Pathogenic Viruses (Colecção Nacional de Vírus Patogénicos).

Tabela 2. Teste da especificidade do kit usando patógenos com potencial reactividade cruzada

Grupo de controlo	HSV-1 (Cycling Green)	HSV-2 (Cycling Orange)	Controlo interno (Cycling Yellow)
Vírus do herpes humano tipo 3 (vírus varicela zóster)	–	–	+
Vírus do herpes humano tipo 4 (vírus Epstein-Barr)	–	–	+
Vírus do herpes humano tipo 5 (citomegalovírus)	–	–	+
Vírus do herpes humano 6A	–	–	+
Vírus do herpes humano 6B	–	–	+
Vírus do herpes humano 7	–	–	+
Vírus do herpes humano 8 (vírus do herpes associado ao sarcoma de Kaposi)	–	–	+
Vírus da hepatite A	–	–	+
Vírus da hepatite B	–	–	+
Vírus da hepatite C	–	–	+
Vírus da imunodeficiência humana (VIH)	–	–	+
HTLV-1	–	–	+
HTLV-2	–	–	+
Enterovírus	–	–	+
Parvovírus B19	–	–	+
Vírus do Oeste do Nilo	–	–	+

Precisão

Os dados de precisão do kit *artus* HSV-1/2 RG PCR foram recolhidos por meio de instrumentos Rotor-Gene e permitem determinar a variância total do ensaio. A variância total consiste na variabilidade intra-ensaio (variabilidade de resultados múltiplos de amostras da mesma concentração numa experiência), na variabilidade inter-ensaio (variabilidade de resultados múltiplos do ensaio criados em vários instrumentos do mesmo tipo por operadores diferentes num laboratório) e na variabilidade inter-lote (variabilidade de resultados múltiplos do ensaio usando vários lotes). Os dados obtidos foram usados para determinar o desvio padrão, a variância, o coeficiente da variação do patógeno específico e o controlo interno para PCR.

Os dados de precisão do kit *artus* HSV-1/2 RG PCR foram recolhidos usando o ADN de HSV-1 e HSV-2 com a concentração de 10 cópias/ μ l. O teste foi realizado com 8 replicações. Os dados de precisão foram calculados com base nos valores C_T das curvas de amplificação (C_T : ciclo limite, ver tabelas 3 e 4). Com base nestes resultados, o intervalo estatístico global de determinada amostra com a concentração mencionada é de 1,82 % (C_T) para HSV-1, 0,67 % (C_T) para HSV-2, e 1,24 % (C_T) e 1,58 % (C_T) respectivamente para a detecção do controlo interno. Estes valores baseiam-se na totalidade dos valores individuais da variabilidade determinada.

Tabela 3. Dados de precisão para HSV-1 com base nos valores C_T

	Valor C_T	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
Variabilidade intra-ensaio: HSV-1 10 cópias/ μ l	30,46	0,25	0,81
Variabilidade intra-ensaio: Controlo interno	25,29	0,08	0,3
Variabilidade inter-ensaio: HSV-1 10 cópias/ μ l	29,69	0,69	2,05
Variabilidade inter-ensaio: Controlo interno	24,97	0,31	1,25
Variabilidade inter-lote: HSV-1 10 cópias/ μ l	29,95	0,40	1,35
Variabilidade inter-lote: Controlo interno	24,90	0,30	1,20
Variância total: HSV-1 10 cópias/ μ l	29,91	0,55	1,82
Variância total: Controlo interno	24,99	0,31	1,24

Tabela 4. Dados de precisão para HSV-2 com base nos valores C_T

	Valor C_T	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
Variabilidade intra-ensaio: HSV-2 10 cópias/ μ l	29,85	0,15	0,50
Variabilidade intra-ensaio: Controlo interno	25,17	0,39	1,55
Variabilidade inter-ensaio: HSV-2 10 cópias/ μ l	29,92	0,15	0,49
Variabilidade inter-ensaio: Controlo interno	25,11	0,41	1,63
Variabilidade inter-lote: HSV-2 10 cópias/ μ l	29,80	0,23	0,79
Variabilidade inter-lote: Controlo interno	24,89	0,33	1,32
Variância total: HSV-2 10 cópias/ μ l	29,88	0,20	0,67
Variância total: Controlo interno	25,07	0,40	1,58

Robustez

A verificação da robustez permite determinar a taxa total de insucesso do kit *artus* HSV-1/2 RG PCR. Para obter títulos virais muito baixos de HSV-1 e HSV-2, foram perfuradas 30 amostras de LCR negativas com 0,36 cópias/ μ l de volume de eluição de HSV-1 ou com 0,48 cópias/ μ l de volume de eluição de ADN de HSV-2 (o triplo da concentração do limite de sensibilidade analítica). Depois da extracção usando o kit EZ1 DSP Virus, estas amostras foram analisadas com o kit *artus* HSV-1/2 RG PCR. Todas as 30 amostras foram avaliadas correctamente como positivas fracas para cada tipo HSV resultando numa taxa de insucesso de 0 %. Para além disso, a robustez do controlo interno foi avaliada por purificação e análise de 30 amostras negativas de LCR para HSV-1 e HSV-2. Não foi detectada inibição da PCR, resultando numa taxa total de insucesso de 0 %. Contudo, a robustez do kit *artus* HSV-1/2 RG PCR é de ≥ 99 %.

Reprodutibilidade

Os dados de reprodutibilidade permitem uma avaliação regular do desempenho do kit *artus* HSV 1/2 RG PCR, bem como uma comparação da eficiência com outros produtos. Estes dados são obtidos pela participação em programas de proficiência estabelecidos.

Equipamento e reagentes a serem fornecidos pelo utilizador

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (SDS) adequadas, disponíveis junto do fornecedor do produto.

- Kit de isolamento de ADN (ver “Isolamento de ADN”, pág. 18)
- Pipetas (ajustáveis)*
- Pontas de pipeta estéreis com filtros
- Misturador de vórtice*
- Centrífuga de bancada* com rotor para tubos de reacção de 2 ml
- Instrumento Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene*† com canais de fluorescência para Cycling Green, Cycling Orange e Cycling Yellow
- Rotor-Gene Q, versão de software 1.7.94 e mais recente (Rotor-Gene 6000, versão de software 1.7.65 e mais recente)
- Tubos e tampas em tiras, 0,1 ml, para usar com rotor de 72 poços (ref.^o 981103 ou 981106)
- Em alternativa: Tubos PCR, 0,2 ml, para usar com rotor de 36 poços (ref.^o 981005 ou 981008)
- Bloco de arrefecimento (bloco de carga 72 x tubos de 0,1 ml, ref.^o 9018901 ou bloco de carga 96 x tubos de 0,2 ml, ref.^o 9018905)

* Assegure-se de que os instrumentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

† O kit *artus* HSV-1/2 RG PCR não pode ser usado com instrumentos Rotor-Gene Q 2plex.

Notas importantes

Precauções gerais

O utilizador deve prestar sempre atenção ao seguinte:

- Use pontas de pipeta estéreis com filtros.
- Armazene e extraia materiais positivos (amostras, controlos positivos e amplicons) em separado de todos os outros reagentes e acrescente-os à mistura de reacção num local à parte.
- Descongele todos os componentes à temperatura ambiente (15-25°C) antes de começar um ensaio.
- Depois de descongelados, misture os componentes (mediante pipetagem repetida para cima e para baixo ou agitando em vórtice pulsado) e centrifugue durante breves instantes.
- Trabalhe com rapidez e mantenha os componentes em gelo ou no bloco de arrefecimento (bloco de carga de 72/96 poços).

Isolamento de ADN

O kit EZ1 DSP Virus (QIAGEN, ref.º 62724*) está validado para purificação de ADN viral de LCR humano para usar com o kit *artus* HSV 1/2 RG PCR.

Purifique o ADN viral segundo as instruções no *Manual do kit EZ1 DSP Virus*.

ⓘ O kit *artus* HSV-1/2 RG PCR não pode ser usado com métodos de isolamento à base de fenol.

ⓘ A utilização do ARN transportador é fundamental para a eficácia de extracção e, por conseguinte, para o rendimento de ADN. Acrescente a quantidade certa de ARN transportador a cada extracção, seguindo as instruções no *Manual do kit EZ1 DSP Virus*.

ⓘ O controlo interno do kit *artus* HSV-1/2 RG PCR pode ser usado directamente no procedimento de isolamento (ver "Controlo interno", abaixo).

* O kit EZ1 DSP Virus também está disponível sob a forma de kits EASYartus® HSV-1/2 RG PCR com a marcação CE-IVD, juntamente com o kit *artus* HSV-1/2 RG PCR (ver pág. 35 para informações para encomenda).

Controlo interno

É fornecido um controlo interno (HSV-1/2 RG IC). Isto permite ao utilizador controlar o procedimento de isolamento de ADN e verificar uma eventual inibição da PCR. Para esta aplicação, acrescente o controlo interno ao isolamento a uma taxa de 0,1 μ l por 1 μ l de volume de eluição. Por exemplo, usando o kit EZ1 DSP Virus, o ADN é eluído em 60 μ l de tampão de eluição (AVE). Assim sendo, devem ser acrescentados inicialmente 6 μ l do controlo interno.

i Não acrescente o controlo interno e o ARN transportador directamente ao material de amostra.

Opcionalmente, o controlo interno pode ser usado apenas para verificar uma eventual inibição da PCR. Para esta aplicação, acrescente o controlo interno directamente à mistura de HSV-1/2 RG Master e HSV-1/2 RG Mg-Sol, tal como descrito no passo 2b do protocolo (pág. 21).

Protocolo: PCR e análise de dados

i Aspectos importantes antes do início do procedimento

- Antes de iniciar o procedimento, leia “Notas importantes”, pág. 18.
- Tome o tempo que for necessário para se familiarizar com o instrumento Rotor-Gene Q antes de iniciar o protocolo. Ver o manual do utilizador do instrumento.
- Certifique-se de que estão incluídos os controlos positivos e um controlo negativo (água, grau PCR) por cada corrida de PCR.

Outros aspectos importantes antes de iniciar o procedimento

- Certifique-se de que o bloco de arrefecimento (acessório do instrumento Rotor-Gene Q) foi pré-arrefecido para 2–8 °C.
- Antes de cada utilização, todos os reagentes precisam de ser totalmente descongelados, misturados (mediante pipetagem repetida para cima e para baixo ou agitando rapidamente em vórtice) e centrifugados durante breves instantes.

Procedimento

- 1. Coloque o número desejado de tubos PCR nos adaptadores do bloco de arrefecimento.**
- 2. Se estiver a usar o controlo interno para monitorizar o procedimento de isolamento de ADN e para verificar uma eventual inibição da PCR, siga o passo 2a.**
Se estiver a usar o controlo interno apenas para verificar a inibição da PCR, siga o passo 2b.
Use o controlo interno segundo o passo 2b para todos os controlos positivos e negativos.
- 2a. O controlo interno já foi acrescentado ao isolamento (ver “Controlo interno”, pág. 19). Neste caso, prepare uma mistura principal (master) segundo a tabela 5.**

A mistura de reacção contém, tipicamente, todos os componentes necessários para PCR, excepto a amostra.

Tabela 5. Preparação da mistura principal (master) (controlo interno usado para monitorizar o isolamento de ADN e verificar a inibição da PCR)

Número de amostras	1	12
HSV-1/2 RG Master	25 μ l	300 μ l
HSV-1/2 RG Mg-Sol	5 μ l	60 μ l
HSV-1/2 RG IC	0 μ l	0 μ l
Volume total	30 μl	360 μl

2b. O controlo interno tem de ser acrescentado directamente à mistura de HSV-1/2 RG Master e HSV-1/2 RG Mg-Sol. Neste caso, prepare uma mistura principal (master) segundo a tabela 6.

A mistura de reacção contém, tipicamente, todos os componentes necessários para PCR, excepto a amostra.

Tabela 6. Preparação da mistura principal (master) (controlo interno usado apenas para verificar a inibição da PCR)

Número de amostras	1	12
HSV-1/2 RG Master	25 μ l	300 μ l
HSV-1/2 RG Mg-Sol	5 μ l	60 μ l
HSV-1/2 RG IC	2 μ l	24 μ l
Volume total	32 μl*	384 μl*

* O aumento de volume causado pela adição de controlo interno é negligenciado ao preparar o ensaio PCR. A sensibilidade do sistema de detecção não é prejudicada.

3. Pipete 30 μ l da mistura principal (master) em cada tubo PCR. A seguir, acrescente 20 μ l da amostra de ADN eluída (ver tabela 7) e misture bem pipetando repetidamente para cima e para baixo. Analogamente, 20 μ l do HSV-1 RG PC e do HSV-2 RG PC têm de ser usados como controlos positivos e 20 μ l de água (água, grau PCR) como controlo negativo.

Tabela 7. Preparação do ensaio PCR

Número de amostras	1	12
Mistura principal (master)	30 μ l	30 μ l cada
Amostra	20 μ l	20 μ l cada
Volume total	50 μl	50 μl cada

4. **Feche os tubos PCR. Certifique-se de que o anel de bloqueio (acessório do instrumento Rotor-Gene) está colocado no topo do rotor para impedir a abertura acidental dos tubos durante a corrida.**
5. **Para a detecção de ADN de HSV-1 ou ADN de HSV-2, crie um perfil de temperatura, de acordo com os seguintes passos.**

Definir os parâmetros gerais de ensaio	Figs. 3, 4, 5
Activação inicial da enzima de começo quente	Fig. 6
Amplificação do ADN	Fig. 7
Ajustar a sensibilidade do canal de fluorescência	Fig. 8
Iniciar a corrida	Fig. 9

Todas as especificações se referem ao Rotor-Gene Q, versões de software 1.7.94 e mais recentes, Rotor-Gene 6000 versões de software 1.7.65, e mais recentes. Para mais informações sobre a programação de instrumentos Rotor-Gene, consulte o manual do utilizador. Nas ilustrações, estas definições estão delimitadas por uma moldura a preto carregado. As ilustrações estão incluídas para os instrumentos Rotor-Gene Q.

6. Primeiro, abra a caixa de diálogo “New Run Wizard” (“Assistente de nova corrida”) com a versão “Advanced” (“Avançado”) (fig. 3). Marque a caixa “Locking Ring Attached” (“Anel de bloqueio preso”) e clique em “Next” (“Seguinte”).

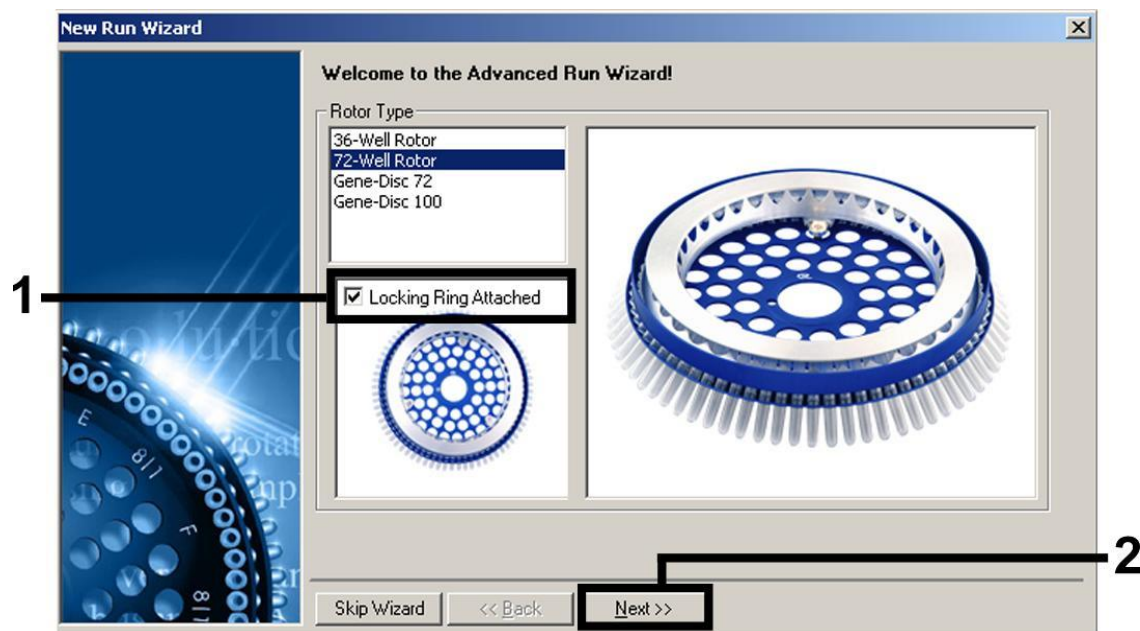


Fig. 3. Caixa de diálogo “New Run Wizard”.

7. Selecciona 50 para o volume de reacção PCR e clique em “Next” (fig. 4).

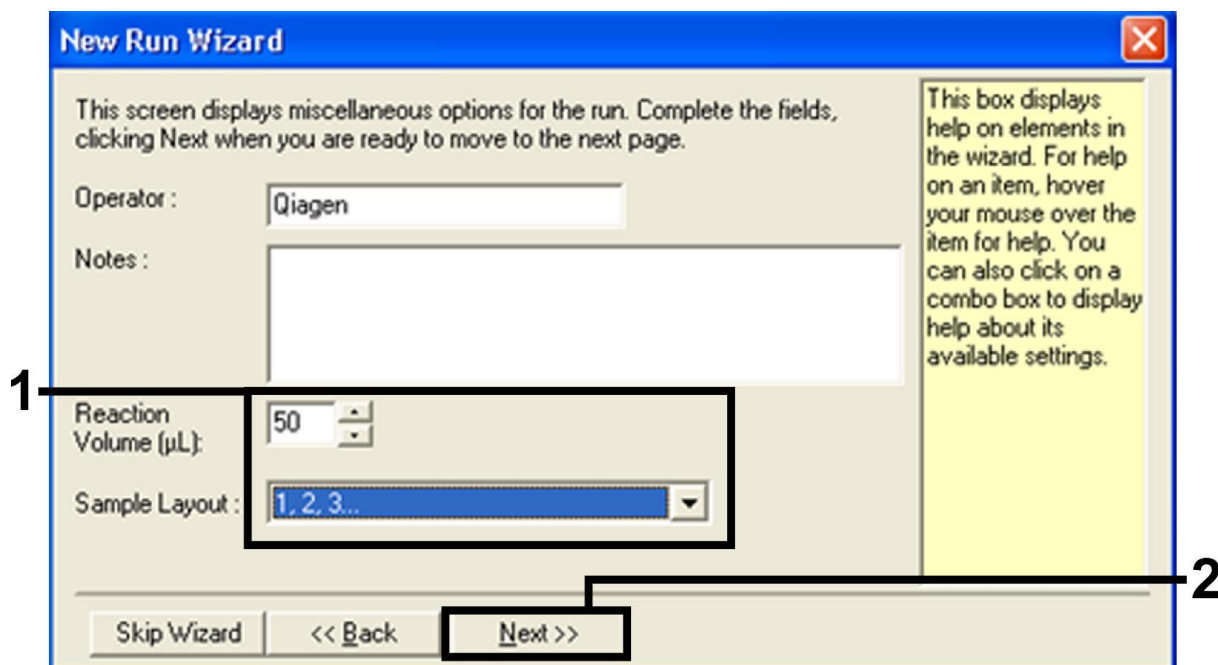


Fig. 4. Definir os parâmetros gerais de ensaio.

8. Clique no botão “Edit Profile” (“Editar perfil”) na caixa de diálogo “New Run Wizard” seguinte (fig. 5) e programe o perfil de temperatura, tal como ilustrado nas figuras 6–7.

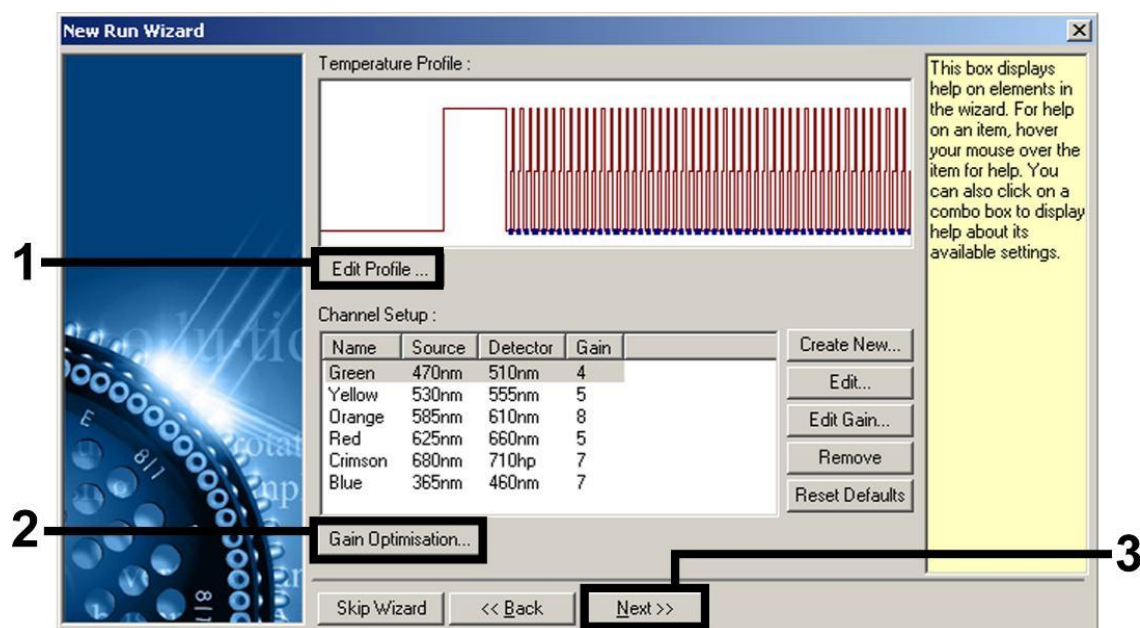


Fig. 5. Editar o perfil.

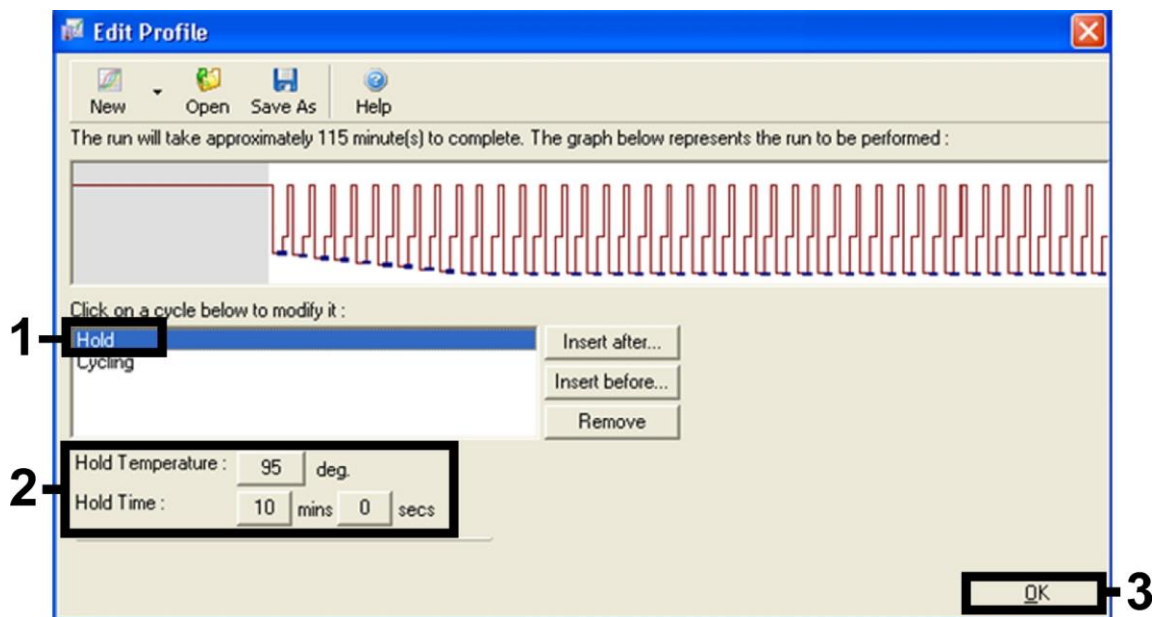


Fig. 6. Activação inicial da enzima de começo quente.

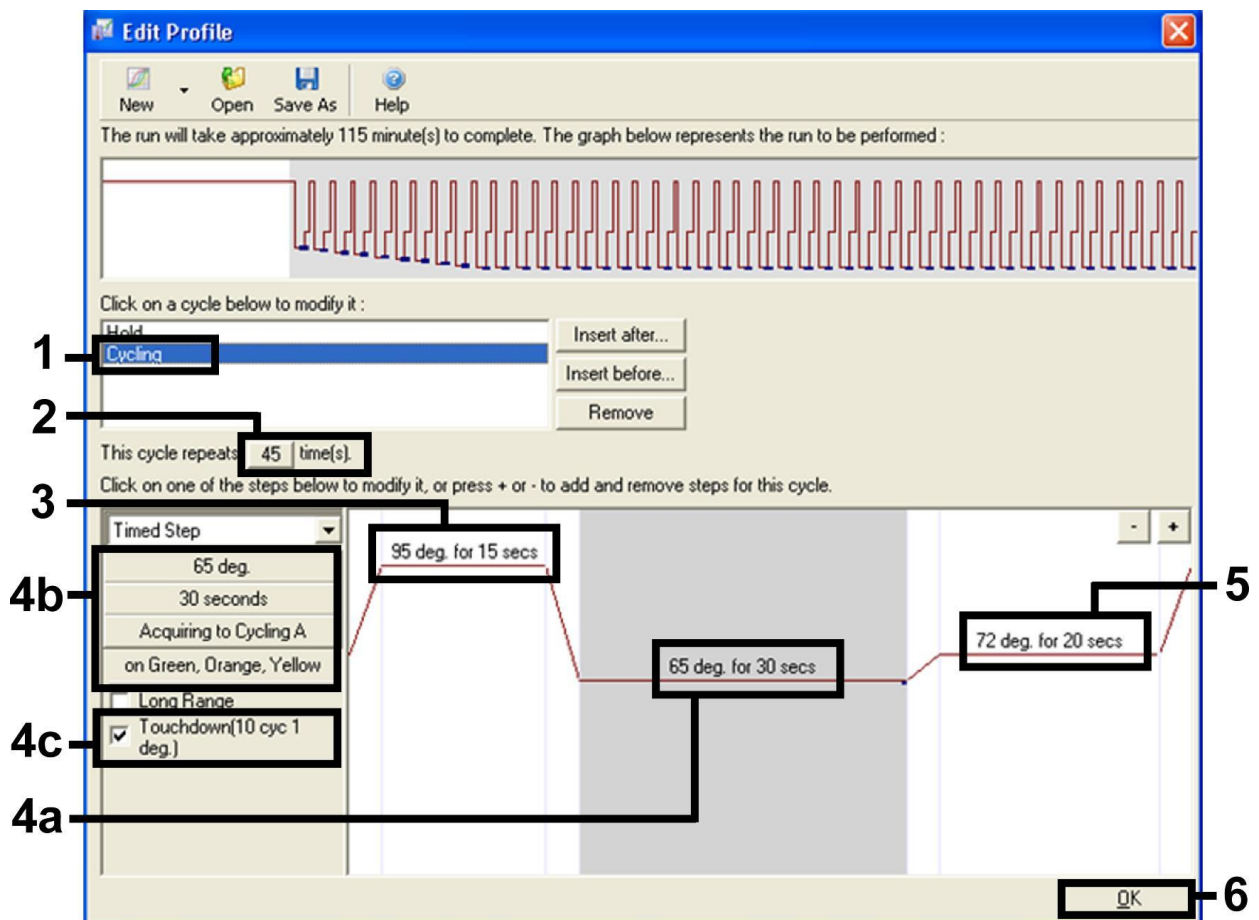


Fig. 7. Amplificação do ADN. Não se esqueça de activar a função "Touchdown" (diminuição de um grau a cada ciclo) para 10 ciclos no passo de "Annealing" ("Anelamento").

9. O intervalo de detecção dos canais de fluorescência tem de ser determinado segundo as intensidades de fluorescência nos tubos PCR. Clique em "Gain Optimisation" ("Optimização do ganho") na caixa de diálogo "New Run Wizard" (ver , passo 2) para abrir a caixa de diálogo "Auto-Gain Optimisation Setup" ("Configuração da optimização do ganho automático") (fig. 8). Defina a temperatura de calibração para 65 para coincidir com a temperatura de anelamento do programa de amplificação (fig. 7, passo 4b). Assegure-se de que todos os três canais (Green, Orange, e Yellow - verde, laranja e amarelo) estão seleccionados para "Auto-Gain Optimisation". (os canais encontram-se no menu pendente em "Channel Settings" ("Definições dos canais"). Clique em "Add" ("Adicionar").) Clique em "Start" ("Iniciar") para começar a optimização do ganho. Clique em "Close" ("Fechar") da caixa de diálogo "Auto-Gain Optimisation Setup" depois de terminada a calibração do ganho.

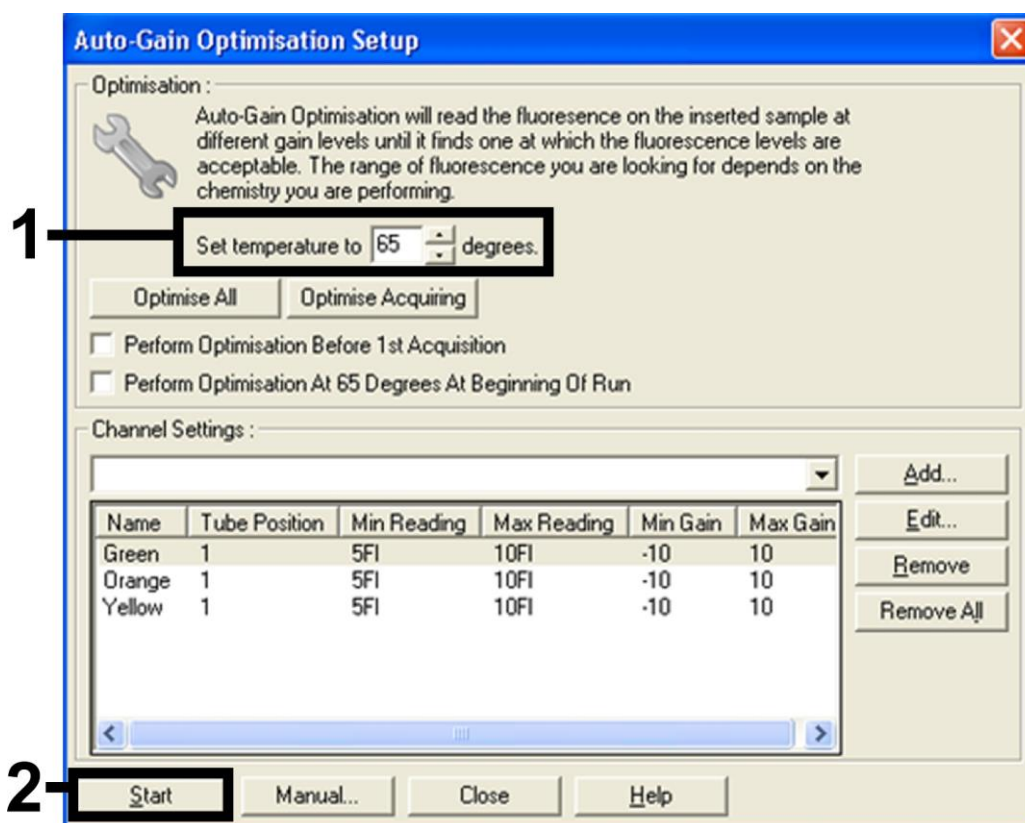


Fig. 8. Ajustar a sensibilidade do canal de fluorescência.

10. Os valores de ganho determinados pela calibração dos canais são guardados automaticamente e listados na janela do último menu do procedimento de programação (fig. 9). Clique em “Start Run” (“Iniciar corrida”).

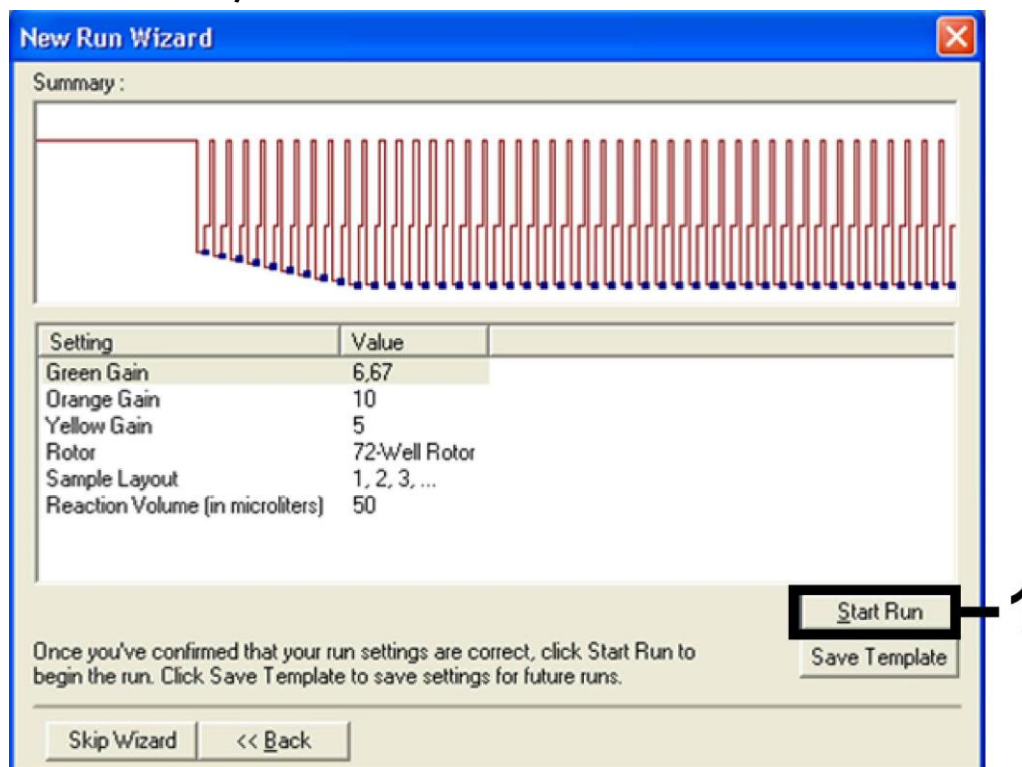


Fig. 9. Iniciar a corrida.

11. Depois de terminada a corrida, analise os dados. São possíveis os resultados seguintes (11a, 11b, 11c, 11d, 11e e 11f).

São dados exemplos de reacções PCR positivas e negativas em Fig. 10, Fig. 11 e Fig. 12.

- 11a. É detectado um sinal no canal de fluorescência Cycling Green. O resultado da análise é positivo: a amostra contém ADN de HSV-1.**

Neste caso, é dispensável a detecção de um sinal do canal Cycling Yellow, dado que as concentrações iniciais de ADN de HSV-1 (sinal positivo no canal Cycling Green) podem levar a um sinal de fluorescência reduzido ou ausente do controlo interno no canal Cycling Yellow (concorrência).

11b. No canal de fluorescência Cycling Green não é detectado nenhum sinal. Ao mesmo tempo, surge um sinal do controlo interno no canal Cycling Yellow.

Na amostra, não é detectável nenhum ADN de HSV-1. Pode ser considerado negativo.

No caso de uma PCR negativa para HSV-1, o sinal detectado do controlo interno impossibilita a inibição da PCR.

11c. É detectado um sinal no canal de fluorescência Cycling Orange. O resultado da análise é positivo: a amostra contém ADN de HSV-2.

Neste caso, é dispensável a detecção de um sinal do canal Cycling Yellow, uma vez que concentrações iniciais elevadas de ADN de HSV-2 (sinal positivo no canal Cycling Orange) podem levar a um sinal de fluorescência reduzido ou ausente do controlo interno no canal Cycling Yellow (concorrência).

11d. No canal de fluorescência Cycling Orange não é detectado nenhum sinal. Ao mesmo tempo, surge um sinal do controlo interno no canal Cycling Yellow.

Na amostra, não é detectável nenhum ADN de HSV-2. Pode ser considerada negativa para HSV-2.

No caso de uma PCR negativa para HSV-2, o sinal detectado do controlo interno impossibilita a inibição da PCR.

11e. É detectado um sinal nos canais de fluorescência Cycling Green e Cycling Orange.

O resultado da análise é positivo: a amostra contém ADN de HSV-1 e de HSV-2.

Neste caso, é dispensável a detecção de um sinal do canal Cycling Yellow, uma vez que concentrações iniciais elevadas de ADN de HSV-1 e de HSV-2 (sinal positivo nos canais Cycling Green e Cycling Orange) podem levar a um sinal de fluorescência reduzido ou ausente do controlo interno no canal Cycling Yellow (concorrência).

11f. Nenhum sinal detectado nos canais Cycling Green, Cycling Orange ou Cycling Yellow.

Não é possível obter nenhum resultado.

Pode encontrar informações relativas a fontes de erro e respectiva solução no "Guia de resolução de problemas", pág. 31.

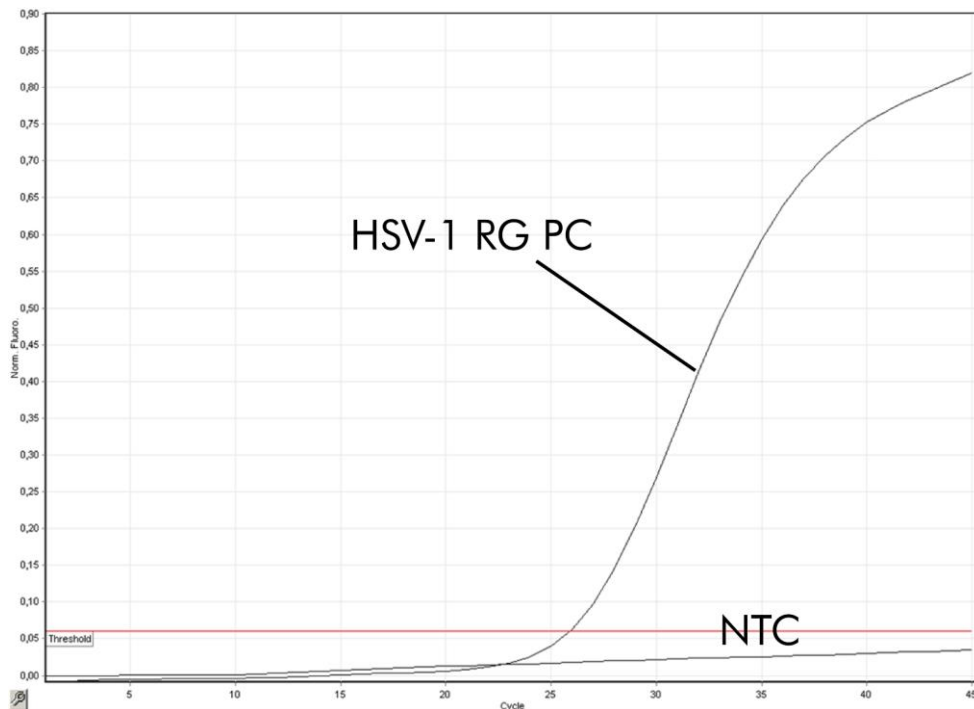


Fig. 10. Detecção do controlo positivo para HSV-1 (HSV-1 RG PC) no canal de fluorescência Cycling Green. NTC: Nenhum controlo de modelo (controlo negativo).

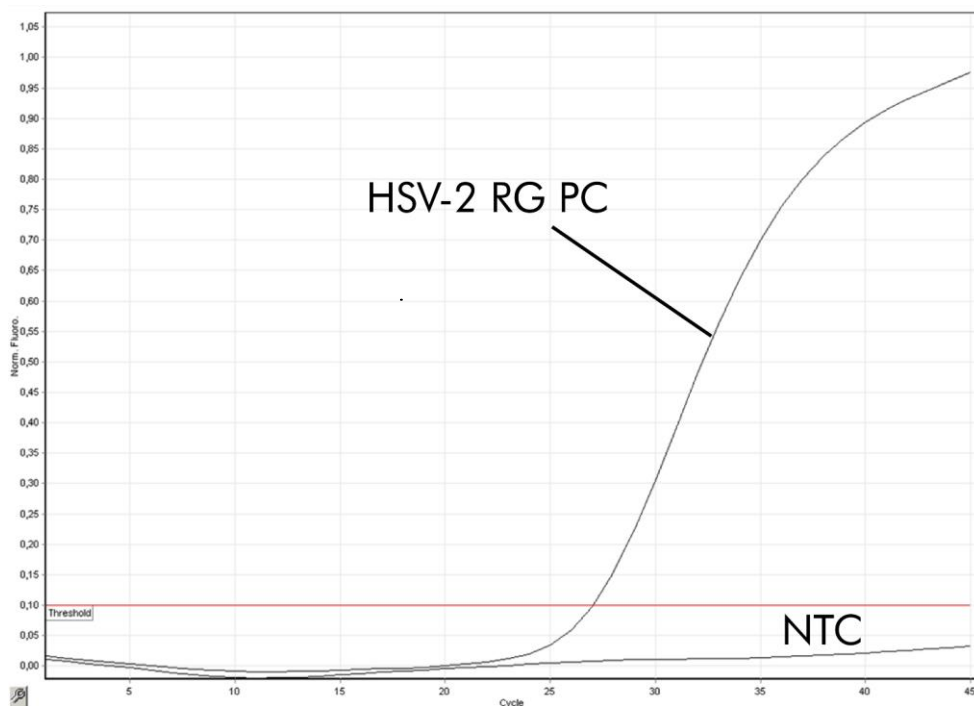


Fig. 11. Detecção do controlo positivo para HSV-2 (HSV-2 RG PC) no canal de fluorescência Cycling Orange. NTC: nenhum controlo de modelo (controlo negativo).

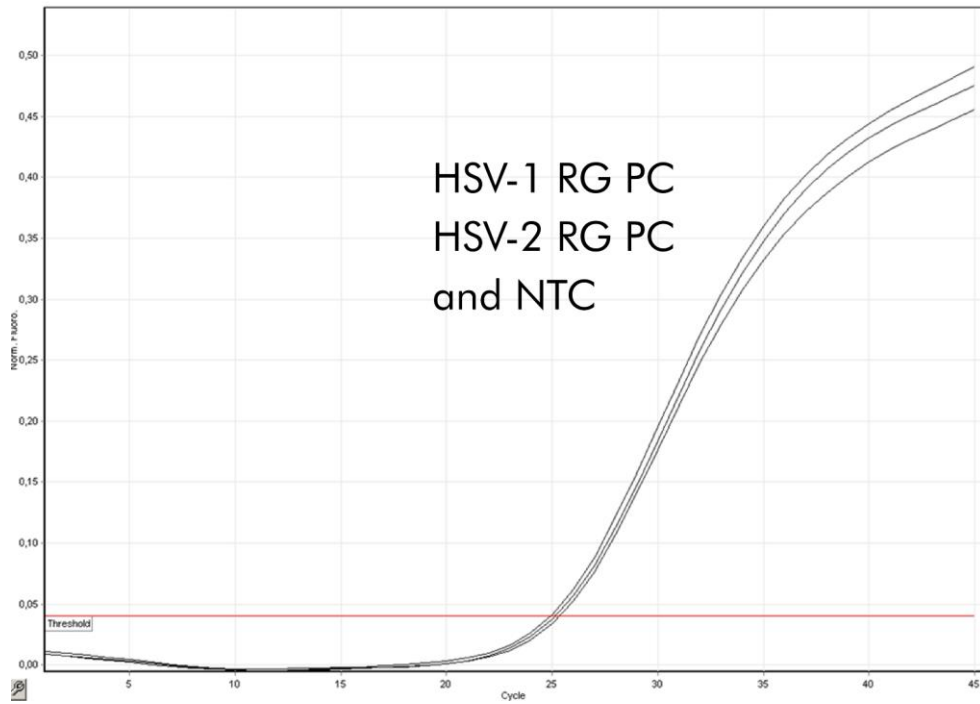







Fig. 12. Detecção do controlo interno (IC) no canal de fluorescência Cycling Yellow com amplificação simultânea dos controlos positivos (HSV-1 RG PC e HSV-2 RG PC). NTC: nenhum controlo de modelo controlo negativo).

Guia de resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para obter mais informações, consulte também a página de perguntas frequentes no nosso Centro de Suporte Técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Os cientistas da Assistência Técnica da QIAGEN estão sempre prontos a responder a qualquer questão que possa ter sobre as informações e protocolos constantes neste manual ou sobre as tecnologias de amostragem e ensaio (para informações de contacto, consulte o verso do manual ou visite www.qiagen.com).

Comentários e sugestões

Nenhum sinal com controlos positivos (HSV-1 RG PC e HSV-2 RG PC) no canal de fluorescência Cycling Green ou Cycling Orange

- | | |
|---|--|
| a) O canal de fluorescência seleccionado para a análise de dados PCR não está em conformidade com o protocolo |  Para a análise de dados, seleccione o canal de fluorescência Cycling Green e Cycling Orange para o HSV-1/2 PCR analítico e o canal de fluorescência Cycling Yellow para a PCR de controlo interno. |
| b) Programação incorrecta do perfil da temperatura do instrumento Rotor |  Compare o perfil da temperatura com o protocolo. Ver “Protocolo: PCR e análise de dados”, pág. 20. |
| c) Configuração incorrecta da PCR |  Verifique os seus passos de trabalho através do esquema de pipetagem e repita a PCR, se necessário. Ver “Protocolo: PCR e análise de dados”, pág. 20. |
| d) As condições de armazenamento de um ou mais componentes do kit não estão em conformidade com as instruções dadas em “Armazenamento” (pág. 5) |  Verifique as condições de armazenamento e o prazo de validade (ver o rótulo do kit) dos reagentes e use um kit novo, se necessário. |
| e) Fim do prazo de validade do kit <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR |  Verifique as condições de armazenamento e o prazo de validade (ver o rótulo do kit) dos reagentes e use um kit novo, se necessário. |

Comentários e sugestões

Sinal fraco ou inexistente do controlo interno de uma amostra de LCR negativa sujeita à purificação usando o kit EZ1 DSP Virus no canal de fluorescência Cycling Yellow e ausência, em simultâneo, de um sinal no canal Cycling Green ou Cycling Orange

- a) As condições PCR não estão em conformidade com o protocolo
- ⓘ Verifique as condições PCR (ver acima) e repita a PCR com as definições corrigidas, se necessário.
- b) A PCR foi inibida
- ⓘ Assegure-se de que usa o método de isolamento recomendado e observe estritamente as instruções do fabricante.
- c) O ADN perdeu-se durante a extracção
- ⓘ Se tiver sido acrescentado controlo interno à extracção, a ausência de sinal do controlo interno pode indicar a perda de ADN durante a extracção. Assegure-se de que usa o método de isolamento recomendado (ver "Isolamento de ADN", pág. 18) e observe estritamente as instruções do fabricante.
- d) As condições de armazenamento de um ou mais componentes do kit não estão em conformidade com as instruções dadas em "Armazenamento" (pág. 5)
- ⓘ Verifique as condições de armazenamento e o prazo de validade (ver o rótulo do kit) dos reagentes e use um kit novo, se necessário.
- e) Fim do prazo de validade do kit *artus* HSV-1/2 RG PCR
- ⓘ Verifique as condições de armazenamento e o prazo de validade (ver o rótulo do kit) dos reagentes e use um kit novo, se necessário.

Sinais com os controlos negativos no canal de fluorescência Cycling Green ou Cycling Orange da PCR analítica

a) Contaminação
ocorrida durante a
preparação da PCR

ⓘ Repita a PCR com novos reagentes em replicações.

ⓘ Se possível, feche os tubos PCR logo depois de ter acrescentado a amostra a ser testada.

ⓘ Assegure-se de que os controlos positivos são pipetados em último lugar.

ⓘ Assegure-se de que o espaço de trabalho e os instrumentos são descontaminados em intervalos regulares.

b) Ocorreu contaminação
durante a extracção

ⓘ Repita a extracção e a PCR da amostra a ser testada usando reagentes novos.

ⓘ Assegure-se de que o espaço de trabalho e os instrumentos são descontaminados em intervalos regulares.

Referências

A QIAGEN mantém uma abrangente base de dados online actualizada de publicações científicas que utilizam produtos QIAGEN. As opções de pesquisa avançada permitem localizar os artigos de que necessita, quer através da pesquisa por uma única palavra-chave, quer especificando a aplicação, área de investigação, título, etc.

Para obter uma lista completa de referências, visite a base de dados de referências da QIAGEN online em www.qiagen.com/RefDB/search.asp ou contacte a Assistência Técnica ou o distribuidor local da QIAGEN.

Informações para encomenda

Produto	Índice	Ref. ^o
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (24)	Para 24 reacções: Principal (master), solução Mg, 2 controlos positivos, controlo interno, água (grau PCR)	4500263
<i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (96)	Para 96 reacções: Principal (master), solução Mg, 2 controlos positivos, controlo interno, água (grau PCR)	4500265
EZ1 DSP Virus Kit — para purificação de ácidos nucleicos virais de LCR humano para fins de diagnóstico in vitro		
EZ1 DSP Virus Kit	Para 48 preparações de ácidos nucleicos virais: cartuchos de reagentes enchidos previamente, porta-pontas descartáveis, pontas com filtro descartáveis, tubos de amostras, tubos de eluição, tampões, ARN transportador	62724
EASYartus HSV-1/2 RG PCR Kits — para a purificação de amostras automatizada integrada, totalmente em conformidade com CE-IVD, e detecção de patógenos		
EASYartus HSV-1/2 RG PCR Kit 1	Para 48 preparações de ácidos nucleicos virais e 24 ensaios: 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 1 x <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (24)	EA10023
EASYartus HSV-1/2 RG PCR Kit 2	Para 48 preparações de ácidos nucleicos virais e 48 ensaios: 1 x EZ1 DSP Virus Kit, 2 x <i>artus</i> HSV-1/2 RG PCR Kit (24)	EA10024
Rotor-Gene Q e acessórios		
Rotor-Gene Q 5plex HRM	Máquina de PCR em tempo real e analisador de fusão de alta resolução com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim) e ainda canal HRM, computador portátil, software, acessórios, garantia de 1 ano relativamente a peças e mão-de-obra	Informese

Produto	Índice	Ref.ª
Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes	Bloco de alumínio para configuração manual da reacção com uma pipeta de um canal em 72 x tubos de 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0,2 ml Tubes	Bloco de alumínio para configuração manual da reacção numa série normal 8 x 12 com 96 x tubos de 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	250 tiras de 4 tubos e tampas para 1000 reacções	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos e tampas para 10 000 reacções	981106
PCR Tubes, 0,2 ml (1000))	1000 tubos de paredes finas para 1000 reacções	981005
PCR Tubes, 0,2 ml (10000)	10 x 1000 tubos de paredes finas para 10 000 reacções	981008

Para informações actuais sobre licenciamento e limitações de responsabilidade específicas do produto, consulte o respectivo manual do kit QIAGEN ou do utilizador. Os manuais do kit QIAGEN e do utilizador estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser pedidos à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

A aquisição deste produto permite que o comprador o use para realizar serviços de diagnóstico humano in vitro. Não é concedida, com isto, uma patente geral ou qualquer outra licença que não seja este direito específico de utilização decorrente da aquisição.

Marcas registadas: QIAGEN®, *artus*®, EZ1®, EASYartus®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group).

O *artus* HSV-1/2 RG PCR Kit e o EZ1 DSP Virus Kit são kits de diagnóstico com a marcação CE segundo a directiva relativa aos dispositivos médicos de diagnóstico in vitro 98/79/CE. Não está disponível em todos os países.

Acordo de Licença Limitada

A utilização deste produto implica a concordância de qualquer comprador ou utilizador do kit *artus* HSV-1/2 RG PCR com os seguintes termos:

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

Para obter os termos de licença actualizados, consulte www.qiagen.com.

© 2009-2014 QIAGEN, todos os direitos reservados.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 55-11-5079-4000 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

China ■ Orders 800-988-0326 ■ Fax 800-988-0329 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-33430-4826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7290 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 1544 7146 ■ Technical 1544 7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax +65-68548184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders +34-91-630-7050 ■ Fax +34-91-630-5145 ■ Technical +34-91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

