

Manual do kit *artus*[®] HBV RG PCR

 24 (n.º de catálogo 4506263)

 96 (n.º de catálogo 4506265)

Versão 1



Diagnóstico in vitro quantitativo

Para utilização com instrumentos Rotor-Gene[®] Q



4506263, 4506265



1046920PT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

ALEMANHA

R4

MAT

1046920PT



QIAGEN Sample and Assay Technologies

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

A QIAGEN é uma empresa de referência em matéria de:


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

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

Índice

Conteúdo do Kit	6
Símbolos	6
Conservação	7
Utilização prevista	7
Limitações da utilização do produto	7
Avisos e precauções	8
Controlo da qualidade	8
Introdução	9
Princípio	9
Informação sobre o agente patogénico	9
Características de desempenho	10
Equipamentos e reagentes não fornecidos	20
Notas Importantes	21
Precauções gerais	21
Colheita, armazenamento e transporte de amostras	21
Isolamento de ADN	23
Controlo interno	23
Definição do limite para a análise por PCR	24
Quantificação	24
Protocolo: PCR e análise de dados	26
Guia para a resolução de problemas	36
Referências	39
Informações para encomenda	40

Conteúdo do Kit

artus HBV RG PCR Kit		(24)	(96)
N.º de catálogo		4506263	4506265
Número de reações		24	96
Azul	HBV RG/TM Master	2 x 12 reações	8 x 12 reações
Vermelho	HBV RG/TM QS 1* (1 x 10 ⁵ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Vermelho	HBV RG/TM QS 2* (1 x 10 ⁴ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Vermelho	HBV RG/TM QS 3* (1 x 10 ³ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Vermelho	HBV RG/TM QS 4* (1 x 10 ² IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Vermelho	HBV RG/TM QS 5* (1 x 10 ¹ IU/μl)	QS 200 μl	200 μl
Verde	HBV RG/TM IC†	IC 1000 μl	2 x 1000 μl
Branco	Água (grau PCR)	1000 μl	1000 μl
	Manual	 1	1

* Padrão de quantificação.

† Controlo interno.

Símbolos



<N>

Contém reagentes suficientes para <N> testes



Prazo de validade



Dispositivo médico para diagnóstico in vitro











Número de catálogo



Número do lote



Número do material

	Componentes
	Contém
	Número
	Número do item de comércio mundial
	Limites de temperatura
	Fabricante
	Consultar as instruções de utilização
	Nota importante

Conservação

Os componentes do kit *artus* HBV RG PCR devem ser conservados entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e são estáveis até ao prazo de validade impresso no rótulo. Deve evitar-se repetir o processo de descongelamento e congelamento (>2 vezes), uma vez que pode reduzir a sensibilidade do ensaio. Se os reagentes se destinarem a ser usados de forma intermitente, devem ser congelados em alíquotas. O armazenamento a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ não pode exceder um período de 5 horas.

Utilização prevista

O kit *artus* HBV RG PCR é um teste de amplificação de ácidos nucleicos in vitro, para a quantificação de ADN do vírus da hepatite B (VHB) no plasma humano. Este kit de teste de diagnóstico utiliza reação em cadeia da polimerase (PCR) e está configurado para ser utilizado com os instrumentos Rotor-Gene Q.

Limitações da utilização do produto

Todos os reagentes podem ser exclusivamente utilizados em diagnóstico in vitro.

O produto deve apenas ser utilizado por pessoal com formação específica em procedimentos de diagnóstico in vitro e devidamente instruído para o efeito.

Para resultados de PCR óptimos, é necessário que as instruções do manual do utilizador sejam rigorosamente observadas.

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

Embora rara, a ocorrência de mutações nas regiões altamente conservadas do genoma viral cobertas pelos iniciadores (primers) e/ou sonda do kit pode resultar em sub-quantificação ou falha em detetar a presença do vírus. A validade e o desempenho do ensaio são revistos regularmente.

Avisos e precauções

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

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

Controlo da qualidade

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

Introdução

O kit *artus* HBV RG PCR é um sistema pronto a utilizar para a deteção de ADN do vírus VHB através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em instrumentos Rotor-Gene Q. O HBV RG/TM Master contém reagentes e enzimas para a amplificação específica de uma região de 134 pb do genoma do VHB e para a deteção direta de fragmentos amplificados específicos no canal de fluorescência Cycling Green do Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene 6000 ou Cycling A.FAM™ do Rotor-Gene 3000.

Ao mesmo tempo, o kit *artus* HBV RG PCR contém um segundo sistema de amplificação heterólogo para identificar uma possível inibição da PCR. Esta inibição é detetada como um controlo interno (IC) no canal de fluorescência Cycling Yellow do Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene 6000, ou A.JOE™ do Rotor-Gene 3000. O limite de deteção da PCR analítica do VHB não é reduzido (ver “Sensibilidade analítica”, página 10). São fornecidos controlos positivos externos (HBV RG/TM QS 1–5), que permitem a determinação da quantidade de ADN viral. Para mais informações, consulte “Quantificação”, na página 24.

Princípio

A deteção de agentes patogénicos pela reação em cadeia da polimerase (PCR) baseia-se na amplificação de regiões específicas do genoma do agente patogénico. Através da PCR em tempo real, o produto amplificado é detetado com recurso a corantes fluorescentes. Estes estão habitualmente aglutinados a sondas de oligonucleotídeos que se ligam especificamente ao produto amplificado. A monitorização das intensidades de fluorescência no decorrer da PCR (ou seja, em tempo real) possibilita a deteção e a quantificação dos produtos sem ter que voltar a abrir os tubos de reação depois de concluída a PCR.*

Informação sobre o agente patogénico

A transmissão do vírus da Hepatite B (VHB) ocorre, na maioria das vezes, através do sangue ou de produtos sanguíneos. No entanto, são também possíveis infeções por transmissão sexual, oral e perinatal. Após um quadro inicial de mal-estar geral, incluindo perda de apetite, vômitos e distúrbios abdominais, cerca de 10-20% dos doentes desenvolvem febre, exantema (erupção cutânea) e apresentam envolvimento articular e muscular. Um quadro de icterícia ocorre após 2-14 dias, podendo ser acompanhado de prurido. Uma hepatite aguda fulminante ocorre em 1% dos infetados e leva frequentemente à morte do paciente. 5-10% dos doentes com hepatite B desenvolve inflamação hepática crónica que pode progredir para cirrose hepática ou carcinoma hepatocelular primário.

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

Características de desempenho

Sensibilidade analítica

Para o kit *artus* HBV RG PCR, foi determinado tanto o limite de detecção analítica quanto o limite de detecção analítica de acordo com a purificação (limite de sensibilidade). O limite de detecção analítica de acordo com a purificação é determinado através de amostras clínicas positivas para o VHB e de acordo com o método de purificação utilizado. O limite de detecção analítica, por sua vez, é determinado sem amostras clínicas e independente do método de purificação através de um padrão com uma determinada concentração.

Para determinar a sensibilidade analítica do kit *artus* HBV RG PCR, foi criada uma série de diluições de 10 a aproximadamente 0,0003 IU/ μ l do VHB, tendo sido, em seguida, analisada com o kit *artus* HBV RG PCR em instrumentos Rotor-Gene. As análises foram efetuadas em 3 dias diferentes em 8 replicações. Os resultados foram determinados por análise de probit. O limite de detecção analítica do kit *artus* HBV RG PCR em conjunto com o Rotor-Gene 3000 é 0,02 IU/ μ l ($p = 0,05$). Isto significa que existe uma probabilidade de 95% de o limite 0,02 IU/ μ l ser detetado.

A equivalência entre o Rotor-Gene 3000 e o Rotor-Gene Q/6000 foi demonstrada com base nas especificações técnicas confirmadas por comparação do desempenho analítico. As análises de probit foram realizadas em ambos os sistemas em paralelo. O limite de detecção analítica no Rotor-Gene Q/6000 situa-se no intervalo de confiança do Rotor-Gene 3000. Consequentemente, o kit *artus* HBV RG PCR pode ser utilizado para a detecção de ADN do VHB no Rotor-Gene Q/6000 com sensibilidade semelhante.

A sensibilidade analítica de acordo com a purificação (kit QIAamp[®] DSP Virus) do kit *artus* HBV RG PCR foi determinada com uma série de diluições do 1^o padrão internacional para o VHB (OMS) de 158 a aproximadamente 0,4 UI/ml do VHB, em amostras clínicas de plasma. Estas foram sujeitas a extração de ADN utilizando o kit QIAamp DSP Virus (volume de extração: 0,5 ml, volume de eluição: 26 μ l). Cada uma das 7 diluições foi analisada com kit *artus* HBV RG PCR em 3 dias diferentes em 8 replicações. Os resultados foram determinados por análise de probit. A figura 1 representa uma ilustração gráfica da análise de probit. O limite de detecção analítica relativa à purificação do kit *artus* HBV RG PCR em combinação com o Rotor-Gene 3000 é de 3,8 IU/ml ($p = 0,05$). Isto significa que existe uma probabilidade de 95% de o limite 3,8 IU/ml ser detetado.

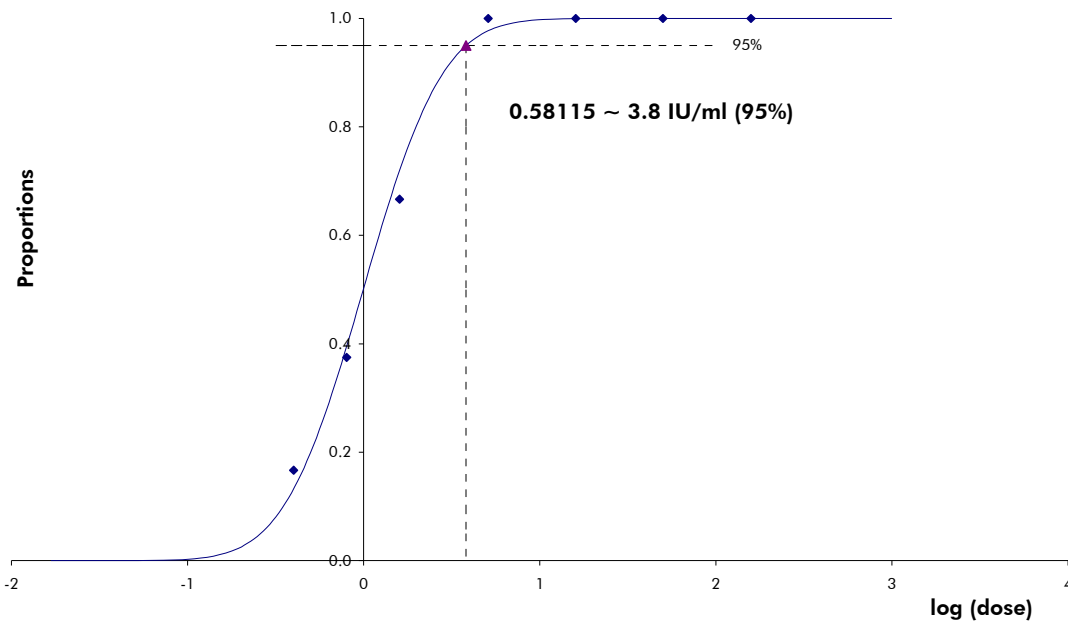


Figura 1. Análise de probit: VHB (Rotor-Gene 3000). Sensibilidade analítica relativa à purificação (Kit QIAamp DSP Virus, QIAGEN) do kit *artus* HBV RG PCR no Rotor-Gene 3000.

Especificidade

A especificidade do kit *artus* HBV RG PCR é, em primeiro lugar, garantida através da seleção dos primers e das sondas, assim como da seleção de condições de reação otimizadas. Os primers e as sondas foram verificados em termos de possível homologia com todas as sequências publicadas nos bancos de genes, por análise comparativa de sequências. A detetabilidade de todos os genótipos relevantes foi assim assegurada por um alinhamento da base de dados e por um ensaio de PCR nos instrumentos Rotor-Gene com os seguintes genótipos (ver a tabela 1).

Tabela 1. Teste da especificidade dos genótipos relevantes.

Vírus	Genótipo	Fonte	HBV (Cycling Green ou A.FAM)	Controlo interno (Cycling Yellow ou A. JOE)
HBV	A (EUA)	Teragenix*	+	+
HBV	B (Indonésia)	Teragenix	+	+
HBV	C (Indonésia)	Teragenix	+	+
HBV	C (Venezuela)	Teragenix	+	+
HBV	D (EUA)	Teragenix	+	+
HBV	E (Costa do Marfim)	Teragenix	+	+
HBV	F (Venezuela)	Teragenix	+	+
HBV	G (EUA)	Teragenix	+	+
HBV	H (Nicarágua)	Teragenix	+	+

* Teragenix Corporation, Flórida, EUA.

Para testes de especificidade adicionais, foram usadas estirpes de VHB com diferenças de sequências conhecidas na região pré-kerne do genoma do VHB (HBV Pre-Core Mutant Panel, Teragenix, Flórida, EUA). Todas as 9 estirpes mutantes do pré-kerne deste painel podem ser detetadas com recurso ao kit *artus* HBV RG PCR.

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

Foi também testada a possibilidade de reacções cruzadas do kit *artus* HBV RG PCR, usando o grupo de controlo listado na tabela 2 (página 14). Nenhum dos patogénios testados demonstrou reactividade. Não ocorreram reacções cruzadas com infecções mistas.

Intervalo linear

O intervalo linear (medida analítica) do kit *artus* HBV RG PCR foi determinado através da análise de uma série de diluições de um padrão de quantificação do VHB numa variação de 1×10^8 UI/ μ l a 1×10^{-2} UI/ μ l. A série de diluições

foi previamente calibrada de acordo com 1º padrão internacional de ADN do VHB.

Todas as etapas de diluição foram testadas em replicações (n = 8 para concentrações $\geq 1 \times 10^0$ IU/ μ l; n = 16 para concentrações $< 1 \times 10^0$ IU/ μ l) com o kit *artus* HBV RG PCR em instrumentos Rotor-Gene.

Tabela 2. Testes de especificidade do kit com agentes patogénicos com potencial de reação cruzada

Grupo de controlo	HBV (Cycling Green ou Cycling A.FAM)	Controlo interno (Cycling Yellow ou Cycling A.JOE)
Vírus do herpes humano 1 (vírus Herpes-simplex 1)	-	+
Vírus do herpes humano 2 (vírus Herpes-simplex 2)	-	+
Vírus do herpes humano 3 (vírus Varicela-zóster)	-	+
Vírus herpes humano 4 (vírus Epstein-Barr)	-	+
Vírus do herpes humano 5 (Citomegalovírus)	-	+
Vírus do herpes humano 6	-	+
Vírus da Imunodeficiência Humana 1	-	+
Vírus da Hepatite A	-	+
Vírus da Hepatite C	-	+
Parvovírus B19	-	+
Vírus da febre amarela	-	+
Vírus da leucemia de células T humano tipo 1 e tipo 2	-	+
Vírus Coxsackie B3	-	+
Vírus da dengue 1-4	-	+
<i>Escherichia coli</i>	-	+

Foi determinado que o intervalo linear do kit *artus* HBV RG PCR abrange concentrações de 0,02 IU/ μ l até, no mínimo, 1 x 10⁸ IU/ μ l (figura 2).

Supondo que o kit QIAamp DSP Virus seja utilizado para a extração do ADN, o kit *artus* HBV RG PCR pode abranger um intervalo linear de 1,1 IU/ml até, no mínimo, 4×10^9 IU/ml.

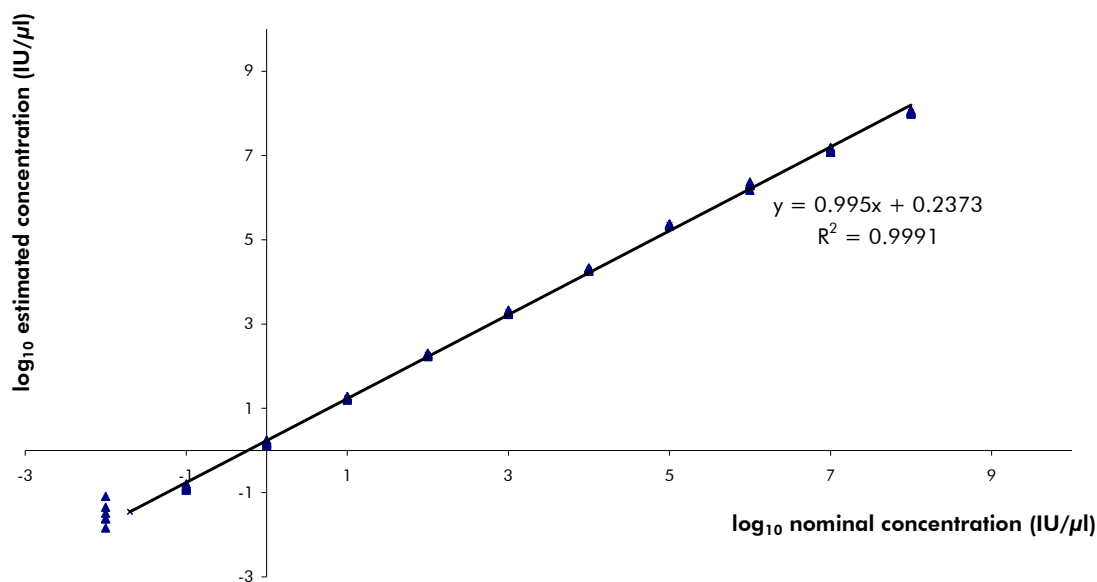


Figura 2. Intervalo linear do kit *artus* HBV RG PCR. Cálculo do intervalo linear. A linha recta foi determinada por uma regressão linear das concentrações calculadas de log₁₀ com as concentrações nominais de log₁₀. A equação da linha de regressão está incluída na figura.

Precisão

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

Os dados de precisão do kit *artus* HBV RG PCR foram recolhidos utilizando o padrão de quantificação com a menor concentração (QS 5; 10 UI/μl). O teste foi realizado com 8 modelos de replicação. Os dados de precisão foram calculados com base nos valores de C_T das curvas de amplificação (C_T: ciclo limite, ver a tabela 3, página 16). Além disso, foram determinados dados de precisão para resultados quantitativos em IU/μl utilizando os valores de C_T correspondentes (tabela 4). Tendo por base estes resultados, a dispersão

estatística global de uma dada amostra com a concentração referida é de 1,29% (C_T) ou 8,99% (concentração), e 1,87% (C_T) para a deteção do controlo interno. Estes valores baseiam-se na totalidade de todos os valores individuais das variabilidades determinadas.

Tabela 3. Dados de precisão com base nos valores de C_T

	Desvio-padrão	Variância	Coefficiente de variação (%)
Variabilidade intra-ensaio: HBV RG/TM QS 5	0,09	0,01	0,32
Variabilidade intra-ensaio: Controlo interno	0,10	0,01	1,06
Variabilidade entre ensaios: HBV RG/TM QS 5	0,14	0,02	0,49
Variabilidade entre ensaios: Controlo interno	0,29	0,08	1,00
Variabilidade entre lotes: HBV RG/TM QS 5	0,38	0,15	1,39
Variabilidade entre lotes: Controlo interno	0,62	0,39	2,23
Variância total: HBV RG/TM QS 5	0,36	0,13	1,29
Variância total: Controlo interno	0,52	0,27	1,87

Tabela 4. Dados de precisão com base nos resultados quantitativos (em IU/ μ l)

	Desvio-padrão	Variância	Coefficiente de variação (%)
Variabilidade intra-ensaio: HBV RG/TM QS 5	0,93	0,87	9,28
Variabilidade entre ensaios: HBV RG/TM QS 5	0,79	0,63	7,92
Variabilidade entre lotes: HBV RG/TM QS 5	1,03	1,05	10,21
Variância total: HBV RG/TM QS 5	0,90	0,81	8,99

Robustez

A verificação da robustez permite apurar a taxa total de erro do kit *artus* HBV RG PCR. Para verificação da robustez, 100 amostras negativas para VHB foram contaminadas com 0,05 IU/ μ l de volume de eluição de ADN de VHB de controlo (uma concentração aproximadamente três vezes superior ao limite de sensibilidade analítica). Após a extração utilizando o kit QIAamp DSP Virus (ver "Isolamento de ADN", página 23), estas amostras foram analisadas com o kit *artus* HBV RG PCR. A taxa de erro para o VHB foi de 0% para a totalidade das amostras. A robustez do controlo interno foi verificada adicionalmente através da purificação e da análise de 100 amostras de plasma negativas para o VHB. A taxa total de erro foi de 0%. Não foram observadas inibições. Deste modo, a robustez do kit *artus* HBV RG PCR é de $\geq 99\%$.

Reprodutibilidade

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

Avaliação diagnóstica

Num estudo realizado em 2 laboratórios independentes, o kit *artus* HBV RG PCR foi comparado com o COBAS[®] TaqMan[®] HBV Assay. Para isso, foram examinadas 287 amostras retrospectivas e prospetivas de plasma.

O isolamento de ADN de VHB para análise do kit *artus* HBV RG PCR foi feito utilizando o kit QIAamp DSP Virus, tendo a análise sido efetuada no instrumento Rotor-Gene 3000. Para a análise comparativa com o COBAS TaqMan HBV Assay, o ADN de VHB foi isolado de acordo com as instruções do fabricante fornecidas no folheto informativo da embalagem. Os resultados obtidos com o kit *artus* HBV RG PCR foram comparados com os obtidos com o COBAS TaqMan HBV Assay.

Em comparação com os resultados obtidos com o COBAS TaqMan HBV Assay como ensaio de referência, é possível determinar uma sensibilidade diagnóstica do kit *artus* HBV RG PCR de 100% e uma especificidade diagnóstica de 97% para a totalidade das amostras de plasma. Estes resultados são representados na tabela 5.

Tabela 5. Resultados do estudo de validação comparativo

		COBAS TaqMan HBV Assay		
		+	-	Total
Kit <i>artus</i> HBV RG PCR	+	186	3	189
	-	0	98	98

Uma posterior análise das 3 amostras discordantes confirmaram os resultados do kit *artus* HBV RG PCR. Assim, pode supor-se que a discrepância se baseia numa maior sensibilidade do kit *artus* HBV RG PCR.

A correlação dos resultados quantitativos dos dois sistemas de teste foi analisada através de uma regressão linear. Os resultados de ambos os kits são mostrados comparativamente na figura 3.

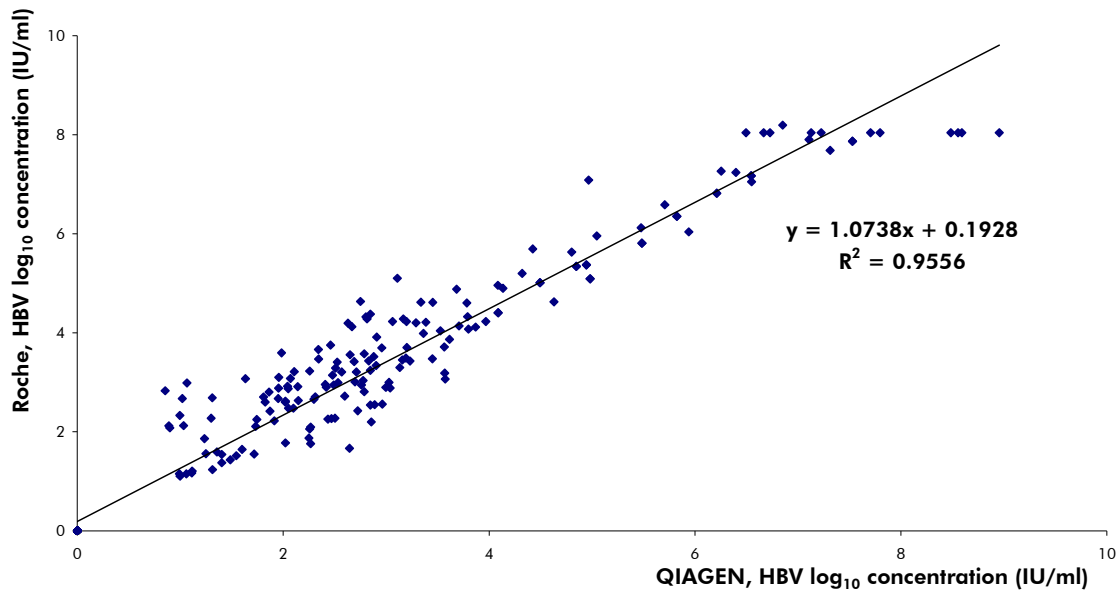


Figura 3. Comparação do **COBAS TaqMan HBV Assay (Roche, HBV; com purificação de amostras utilizando o sistema High Pure)** com o **kit artus HBV RG PCR (QIAGEN, HBV; com purificação de amostras utilizando o kit QIAamp DSP Virus)**. A correlação dos resultados quantitativos dos dois sistemas (tabela 5) de teste foi analisada através de uma regressão linear. Os resultados de ambos os kits são mostrados num gráfico XY (dispersão) com escala logarítmica .

Equipamentos e reagentes não fornecidos

Ao trabalhar com produtos químicos, usar sempre equipamento de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. 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”, página 23)
- Pipetas (ajustáveis)*
- Pontas de pipetas estéreis com filtros
- Misturador vórtex*
- Centrífuga de bancada* com rotor para tubos de ensaio de 2 ml
- Instrumento Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene* com canais de fluorescência para Cycling Green e Cycling Yellow ou com canais de fluorescência para Cycling A.FAM e Cycling A.JOE
- Rotor-Gene Q, versão de software 1.7.94 (Rotor-Gene 6000, versão de software 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; Rotor-Gene 3000, versão de software 6.0.23) ou posterior
- Strip Tubes and Caps (Tiras de tubos e tampas), 0,1 ml, para utilização com o rotor de 72 poços (n.º cat. 981103 ou 981106)
- Alternativamente: PCR Tubes (Tubos de PCR) , 0,2 ml, para utilização com o rotor de 36 poços (n.º cat. 981005 ou 981008)
- Cooling block (Bloco de refrigeração) (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (Bloco de carregamento, 72 tubos de 0,1 ml), n.º cat. 9018901, ou Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes (Bloco de carregamento, 96 tubos de 0,2 ml), n.º cat. 9018905)

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

Notas Importantes

Precauções gerais

○ utilizador deve ter sempre em atenção o seguinte:

- Utilizar pontas de pipetas estéreis com filtros.
- Armazenar e extrair materiais positivos (amostras, controlos positivos e fragmentos amplificados) separadamente dos restantes reagentes e adicioná-los à mistura de reação numa unidade situada num espaço separado.
- Descongelar completamente todos os componentes à temperatura ambiente (15–25 °C) antes de dar início a um ensaio.
- Assim que estiverem descongelados, misturar os componentes (pipetando repetidamente para cima e para baixo ou aplicando impulsos no vórtex) e centrifugar brevemente.
- Trabalhar com rapidez e manter os componentes em gelo ou no bloco de refrigeração (bloco de carregamento de 72/96 poços).

Colheita, armazenamento e transporte de amostras

ⓘ Todas as amostras têm de ser tratadas como material potencialmente infeccioso.

ⓘ Os estudos atuais apontam o plasma tratado com EDTA ou citrato como os materiais de amostra mais adequados para deteção do VHB. Por isso, recomendamos a utilização destes materiais com o kit *artus* HBV RG PCR.

A validação interna do kit *artus* HBV RG PCR foi efetuada usando amostras de plasma humano tratado com EDTA. Não existem outras amostras validadas. Utilizar apenas o kit de ácido nucleico recomendado (ver “Isolamento de ADN”, página 23) para a preparação das amostras.

○ uso de determinados materiais tem de ser rigorosamente observado, bem como as instruções relativas a transporte e armazenamento.

Colheita de amostras

Toda colheita de sangue leva a uma lesão dos vasos sanguíneos (artérias, veias, capilares). Devem apenas ser usados materiais inócuos e estéreis. Estão disponíveis materiais descartáveis para colheita de sangue. Para a punção de veias, não se devem utilizar agulhas muito finas. A colheita de sangue venoso deve ser feita em locais adequados na região da dobra do cotovelo, do antebraço ou do dorso da mão. O sangue deve ser colhido em tubos de amostra padrão (tampa vermelha, Sarstedt ou tubos equivalentes de outros

fabricantes). Deve ser colhido um volume de 5-10 ml de sangue tratado com EDTA. Inverter os tubos diretamente após colheita da amostra (8 vezes, não agitar).

i Não devem ser usadas amostras de indivíduos tratados com heparina (ver “Substâncias interferentes, na página abaixo).

Armazenamento de amostras

O sangue total deve ser separado em plasma e componentes celulares por centrifugação durante 20 minutos a 800–1600 x g no prazo de 6 horas. O plasma isolado tem de ser transferido para tubos de polipropileno estéreis. A sensibilidade do ensaio pode ser comprometida através da repetida congelação ou de uma conservação mais longa da amostra. O ADN de vírus encapsulados apresenta estabilidade durante dias, se armazenado a 4 °C, durante semanas se armazenado a -20 °C e durante meses a anos quando armazenado a -70 °C.*

Transporte de amostras

O material de amostra deve ser transportado num contentor de transporte à prova de estilhaço. O perigo potencial de infeção devido a fuga da amostra pode, assim, ser evitado. As amostras devem ser transportadas de acordo com as instruções locais e nacionais para o transporte de material patogénico.†

As amostras devem ser enviadas no prazo de 6 horas. A conservação no local da colheita não é recomendada. É possível enviar as amostras por correio, de acordo com os regulamentos para o transporte de material patogénico.

Recomenda-se o transporte das amostras por serviços de correio expresso. As amostras de sangue devem ser enviadas refrigeradas (2–8 °C), enquanto que o plasma separado deve ser enviado congelado (-15 a -30 °C).

Substâncias interferentes

Valores elevados de bilirrubina (≤ 15 mg/dl) e de lípidos (≤ 800 mg/dl), assim como amostras hemolíticas, não influenciam o sistema. A heparina (≥ 10 IU/ml) afeta a PCR. As amostras que tenham sido colhidas em tubos heparinizados não devem ser utilizadas. As amostras de doentes tratados com heparina também não devem ser usadas.

* Arbeitskreis Blut, V17 (09.1997), Bundesgesundheitsblatt 11/1997, p. 452–456.

† International Air Transport Association (IATA, Associação Internacional de Transporte Aéreo). Dangerous Goods Regulations (Regulamentos para Mercadorias Perigosas).

Isolamento de ADN

O kit QIAamp DSP Virus Kit (QIAGEN, n.º cat. 60704) está validado para purificação de ADN viral obtido de plasma humano para utilização com o kit *artus* HBV RG PCR. Realizar a purificação de ADN viral em conformidade com as instruções constantes do *Manual do Kit QIAamp DSP Virus*.

i A adição de ARN transportador é de grande importância para a eficiência e, com isso, para o rendimento do ADN/ARN. Para aumentar a estabilidade do ARN transportador fornecido com o kit QIAamp DSP Virus, deverão ser seguidas as indicações sobre a reconstituição e conservação do ARN transportador descritas no manual de instruções ("Preparação de reagentes e tampões").

i O controlo interno do kit *artus* HBV RG PCR pode ser utilizado diretamente no procedimento de isolamento (ver "Controlo interno", abaixo). Certificar-se de que é adicionada uma amostra negativa de plasma à purificação. O sinal correspondente do controlo interno aí contido funciona como base para a avaliação da purificação.

Controlo interno

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

i O controlo interno e ARN transportador (ver "Isolamento de ADN", página 23) só devem ser adicionados à mistura de tampão de lise e amostra ou diretamente ao tampão de lise.

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

i Não adicionar o controlo interno e o ARN transportador diretamente na amostra.

Para a purificação ser considerada eficaz, o valor C_T do controlo interno de uma amostra negativa de plasma processada durante a purificação (kit QIAamp DSP Virus) tem de ser $C_T = 29 \pm 3$ (limite: 0,03) utilizando instrumentos Rotor-Gene Q. A dispersão indicada baseia-se na variação do instrumento e na purificação. Um desvio maior aponta para problemas na purificação. Neste caso, é necessário analisar e, eventualmente, revalidar a purificação. Em caso de dúvidas ou problemas, contactar a Assistência Técnica da QIAGEN.


O controlo interno pode ser utilizado, opcionalmente, exclusivamente para verificar uma possível inibição da PCR. Para este fim, adicionar o controlo interno diretamente no HBV RG/TM Master, tal como descrito no passo 2b do protocolo (página 27).

Definição do limite para a análise por PCR

As definições de limiar ideal para uma determinada combinação do instrumento Rotor-Gene Q e do kit *artus* RG PCR devem ser empiricamente configuradas, testando cada combinação individual, uma vez que se trata de um valor relativo que depende do processo de diagnóstico geral. Como ponto de partida, o limite pode ser definido num valor preliminar de 0,04 para a análise do primeiro procedimento de ensaio de PCR, mas este valor deve ser redefinido numa análise comparativa dos procedimentos de análise seguintes do processo. O limite deve ser definido manualmente mesmo acima do sinal de fundo dos controlos negativos e amostras negativas. O valor limite médio calculado a partir destas experiências irá certamente funcionar para a maioria dos procedimentos de ensaio futuros, mas o utilizador deve, contudo, rever em intervalos regulares o valor limite gerado. O valor limite situar-se-á, normalmente, no intervalo de 0,03–0,05 e deve ser arredondado para não mais do que três casas decimais.

Quantificação

Os padrões de quantificação fornecidos (HBV RG/TM QS 1–5) são tratados como amostras previamente purificadas e utilizados no mesmo volume (20 μ l). Para gerar uma curva padrão nos instrumentos Rotor-Gene Q, todos os 5 padrões de quantificação devem ser usados e definidos na caixa de diálogo “Edit Samples” (Editar amostras) como padrões com as concentrações especificadas (consultar o manual do utilizador do instrumento).

 Os padrões de quantificação são definidos como IU/ μ l.* Para a conversão dos valores apurados com base na curva padrão em UI/ml de amostra, deve-se utilizar a seguinte fórmula:

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

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

* O padrão foi calibrado utilizando o 1º padrão internacional para o VHB (OMS).

Protocolo: PCR e análise de dados



Pontos importantes antes de iniciar o procedimento

- Antes de dar início ao procedimento, ler “Notas Importantes”, páginas 21–24.
- Familiarizar-se com o Rotor-Gene Q antes de dar início ao protocolo. Consultar o manual do utilizador do instrumento.
- Assegurar-se de que, pelo menos, um dos padrões de quantificação e um controlo negativo (água, grau de PCR) são incluídos por ensaio de PCR. Para gerar uma curva padrão, utilize todos os 5 padrões de quantificação fornecidos (HBV RG/TM QS 1–5) para cada ensaio de PCR.

Outros aspetos importantes antes de iniciar o procedimento

- Assegurar que o bloco de refrigeração (acessório do instrumento Rotor-Gene Q) é pré-arrefecido para 2–8 °C.
- Antes de cada utilização, todos os reagentes têm de ser completamente descongelados, misturados (por pipetagem repetida para cima e para baixo ou por ação rápida do vórtex) e brevemente centrifugados.

Procedimento

- 1. Colocar o número de tubos de PCR pretendidos nos adaptadores do bloco de refrigeração.**
- 2. Em caso de utilização do controlo interno para monitorizar o procedimento de isolamento de ADN e verificar uma possível inibição da PCR, seguir o passo 2a. Em caso de utilização do controlo interno para verificar exclusivamente a inibição da PCR, seguir o passo 2b.**
- 2a. O controlo interno já foi adicionado ao isolamento (ver “Controlo interno”, página 23). Neste caso, preparar uma master mix de acordo com a tabela 6.**

Tabela 6. Preparação da master mix (controlo interno utilizado para monitorizar o isolamento de ADN e para verificar a inibição da PCR)

Número de amostras	1	12
HBV RG/TM Master	30 μ l	360 μ l
HBV RG/TM IC	0 μ l	0 μ l cada
Volume total	30 μl	360 μl cada

2b. O controlo interno tem de ser adicionado diretamente ao HBV RG/TM Master. Neste caso, preparar uma master mix de acordo com a tabela 7.

A mistura de reação contém tipicamente todos os componentes necessários para a PCR exceto a amostra.

Tabela 7. Preparação da master mix (controlo interno utilizado exclusivamente para monitorizar a inibição da PCR)

Número de amostras	1	12
HBV RG/TM Master	30 μ l	360 μ l
HBV RG/TM IC	2 μ l	24 μ l
Volume total	32 μl*	384 μl*

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

3. Pipetar 30 μ l da master mix para cada tubo de PCR. De seguida, adicionar 20 μ l de ADN da amostra eluída (ver a tabela 8). Da mesma forma, deverão ser utilizados 20 μ l de, pelo menos, um dos padrões de quantificação (HBV RG/TM QS 1–5) como controlo positivo e 20 μ l de água (água, grau de PCR) como um controlo negativo.

Tabela 8. Preparação do ensaio por PCR

Número de amostras	1	12
Master mix	30 μ l	30 μ l cada
Amostra	20 μ l	20 μ l cada
Volume total	50 μl	50 μl cada

- 4. Fechar os tubos de PCR. Assegurar-se de que o anel de bloqueio (acessório do Instrumento Rotor-Gene) é colocado no topo do rotor para evitar a abertura acidental dos tubos durante o ensaio.**
- 5. Para a detecção de ADN do VHB, crie um perfil de temperatura de acordo com os passos a seguir indicados.**

Definição dos parâmetros de ensaio gerais	Figuras 4, 5, 6
Ativação inicial da enzima de começo quente	Figura 7
Amplificação do ADN	Figura 8
Ajustar a sensibilidade do canal de fluorescência	Figura 9
Iniciar o ensaio	Figura 10

Todas as especificações referem-se ao Rotor-Gene Q, versão de software 1.7.94, Rotor-Gene 6000, versão de software 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 e Rotor-Gene 3000, versão de software 6.0.23. É possível encontrar mais informações sobre a programação dos instrumentos Rotor-Gene no manual do utilizador do instrumento. Estas definições estão enquadradas a negrito, nas ilustrações que se seguem. As ilustrações são incluídas para os instrumentos Rotor-Gene Q. Sempre que forem necessários valores diferentes para o Rotor-Gene 3000, estas diferenças são descritas no texto.

6. Primeiro, começar por abrir a caixa de diálogo “New Run Wizard” (Assistente de novo ensaio) (figura 4). Marcar a caixa “Locking Ring Attached” (Anel bloqueador conectado) e clicar em “Next” (Seguinte).

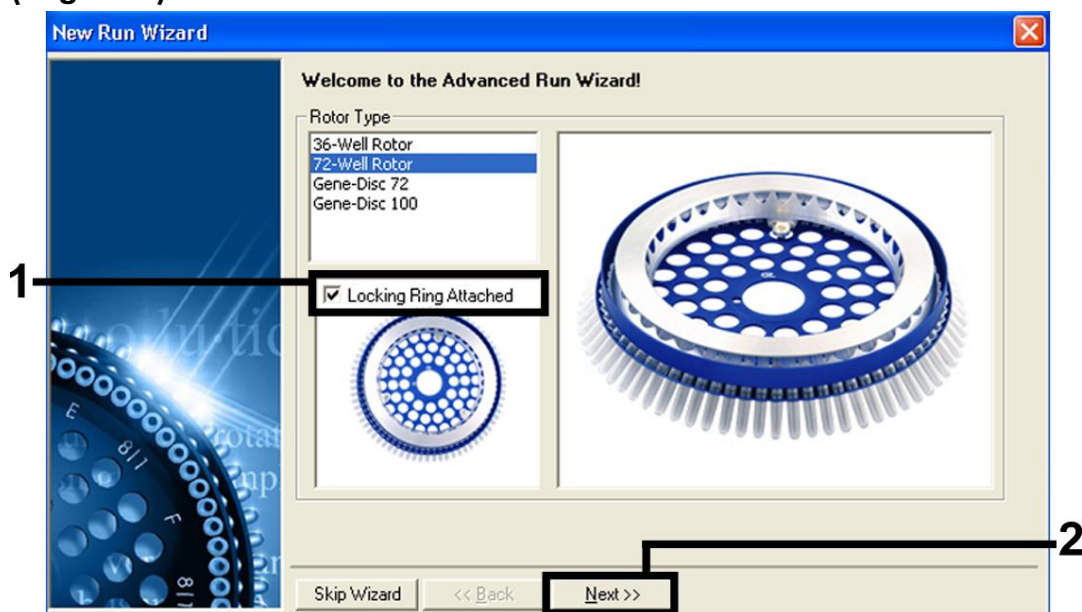


Figura 4. A caixa de diálogo “New Run Wizard”.

7. Selecionar 50 para o volume de reação da PCR e clicar em “Next” (figura 5).

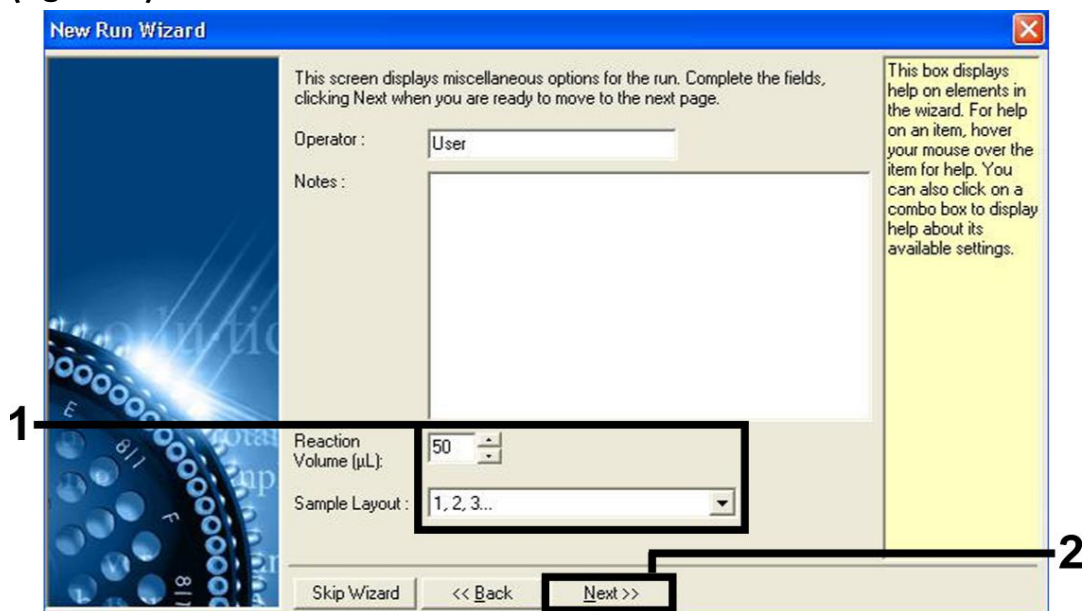


Figura 5. Definição dos parâmetros de ensaio gerais.

8. Clicar no botão “Edit Profile” (Editar perfil) na caixa de diálogo seguinte do “New Run Wizard” (figura 6) e programar o perfil de temperatura conforme se mostra nas figuras 6–8).

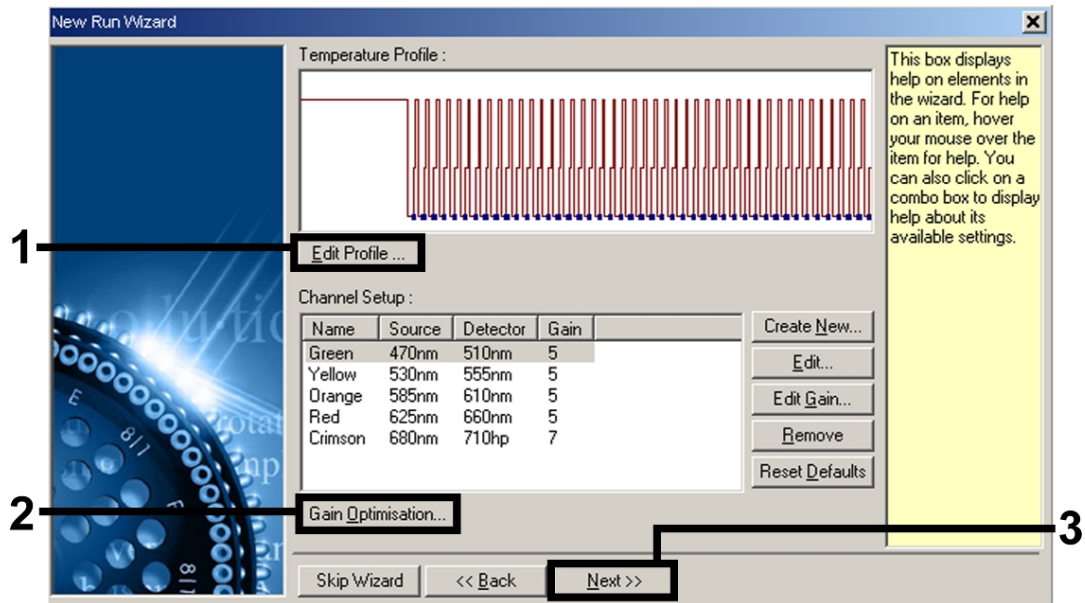


Figura 6. Edição do perfil.

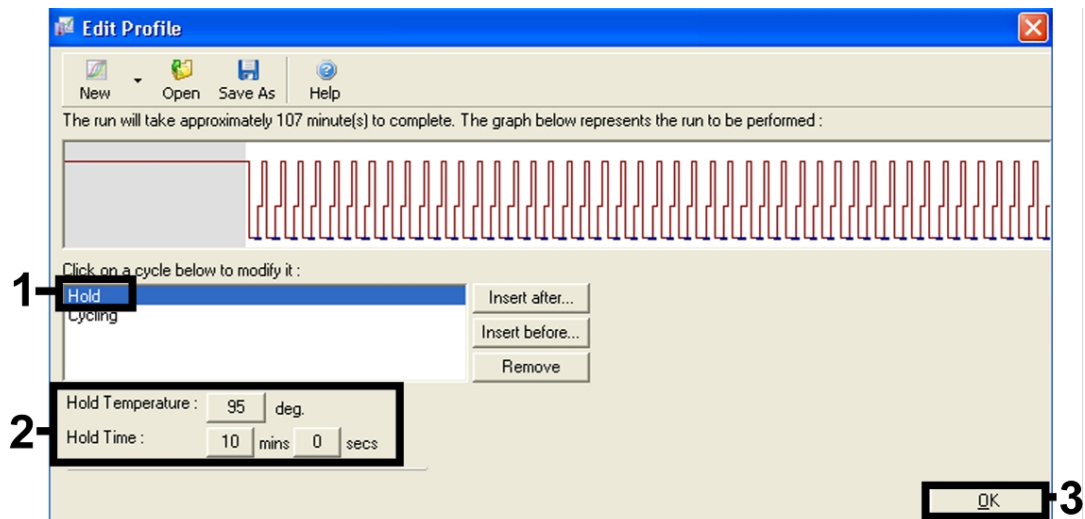


Figura 7. Ativação inicial da enzima de começo quente.

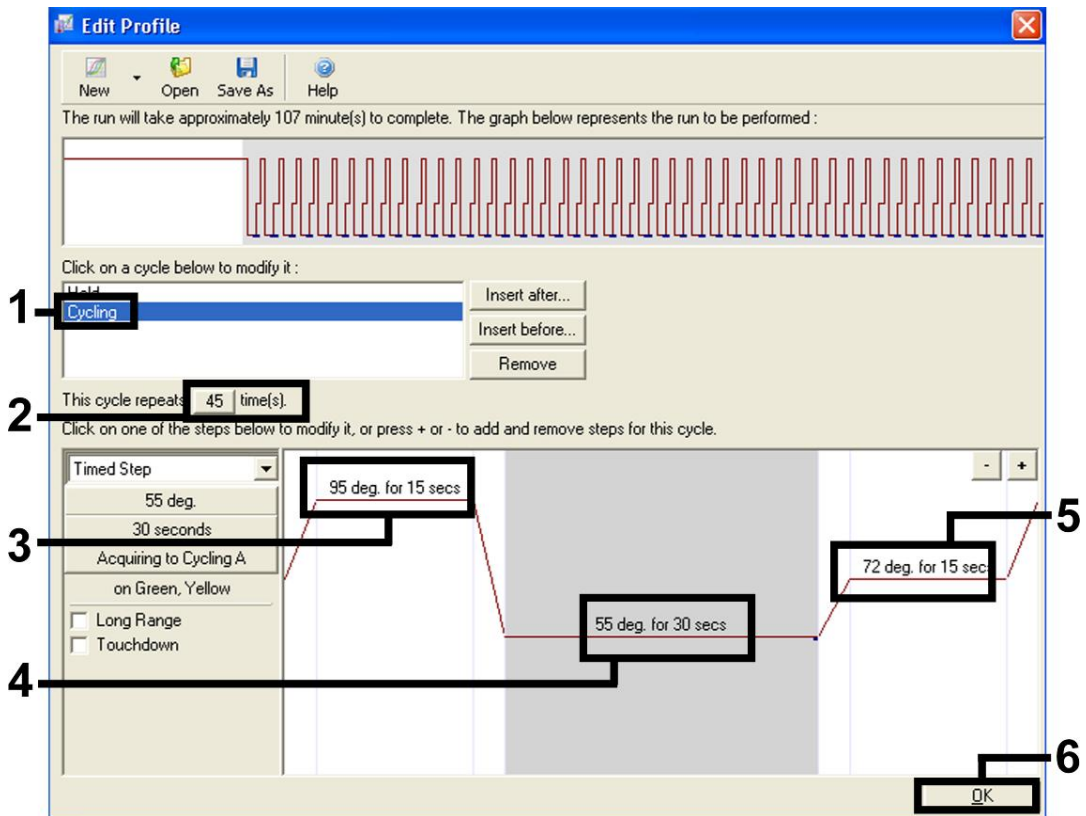


Figura 8. Amplificação do ADN. Ter em atenção que, no Rotor-Gene 3000, o software irá definir os corantes fluorescentes como "FAM/Sybr, JOE".

9. O intervalo de detecção dos canais de fluorescência tem de ser determinado de acordo com as intensidades de fluorescência nos tubos de PCR. Clicar em "Gain Optimisation" (Otimização de ganho) na caixa de diálogo "New Run Wizard" (ver figura 6) para abrir a caixa de diálogo "Auto-Gain Optimisation Setup" (Configuração da otimização automática de ganho). Definir a temperatura de calibração para 55 para igualar a temperatura de hibridização do programa de amplificação (figura 9).

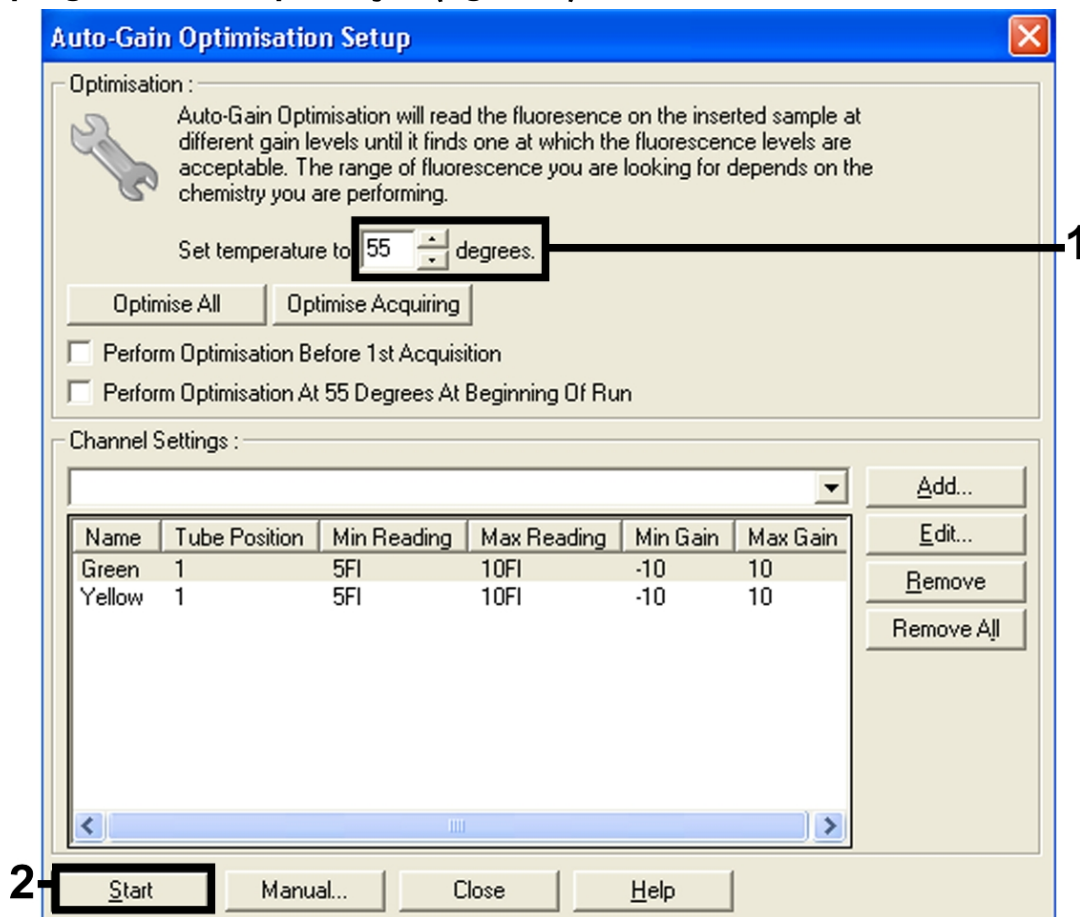


Figura 9. Ajustar a sensibilidade do canal de fluorescência. Ter em atenção que, no Rotor-Gene 3000, o software irá definir os corantes fluorescentes como "FAM/Sybr" e "JOE".

10. Os valores de ganho determinados pela calibração de canais são guardados automaticamente e são enumerados na última janela do menu do procedimento de programação (figura 10). Clique em “Start Run” (Iniciar ensaio).

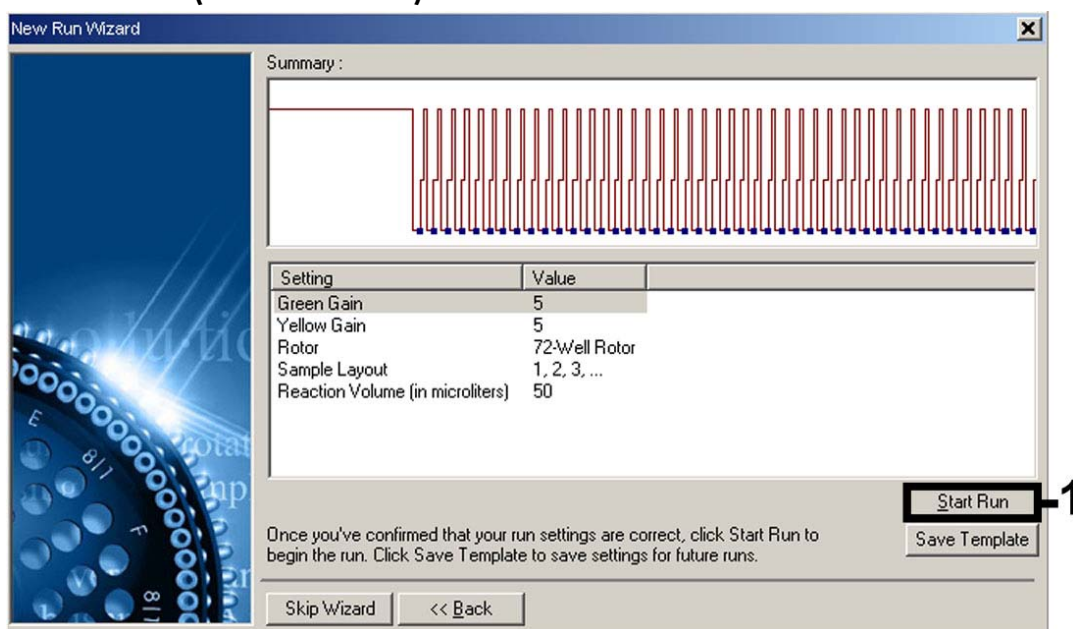


Figura 10. Iniciar o ensaio. Ter em atenção que, no Rotor-Gene 3000, o software irá definir os corantes fluorescentes como “FAM/Sybr” e “JOE”.

11. Após completar o ensaio, analisar os dados. Os seguintes resultados (11a, 11b e 11c) são possíveis.

A figura 11 e a figura 12 apresentam exemplos de reações de PCR positivas e negativas.

- 11a. É detetado um sinal no canal de fluorescência Cycling Green. O resultado da análise é positivo: a amostra contém ADN do VHB.

Neste caso, a deteção de um sinal no canal Cycling Yellow é dispensável, uma vez que as concentrações iniciais elevadas de ADN de VHB (sinal positivo no canal Cycling Green) podem levar a um sinal de fluorescência reduzido ou ausente do controlo interno no canal Cycling Yellow (competição).

i Ter em atenção que, no Rotor-Gene 3000, os canais relevantes são Cycling A.FAM para o sinal positivo e Cycling A.JOE para o controlo interno.

11b. Não é detetado sinal no canal de fluorescência Cycling Green. Ao mesmo tempo, aparece um sinal do controlo interno no canal Cycling Yellow (Ciclo Amarelo).

Não é detetável ADN de VHB na amostra. Pode ser considerado negativo.

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

i Ter em atenção que, no Rotor-Gene 3000, os canais relevantes são Cycling A.JOE para o controlo interno e uma ausência de sinal para Cycling A.FAM.

11c. Não é detetado sinal nos canais Cycling Green ou Cycling Yellow. Não pode inferir-se qualquer resultado.

É possível encontrar informações sobre as origens de erros e respetivas soluções em “Guia para a resolução de problemas”, página 36.

i Ter em atenção que, no Rotor-Gene 3000, os canais relevantes são Cycling A.FAM e Cycling A.JOE.

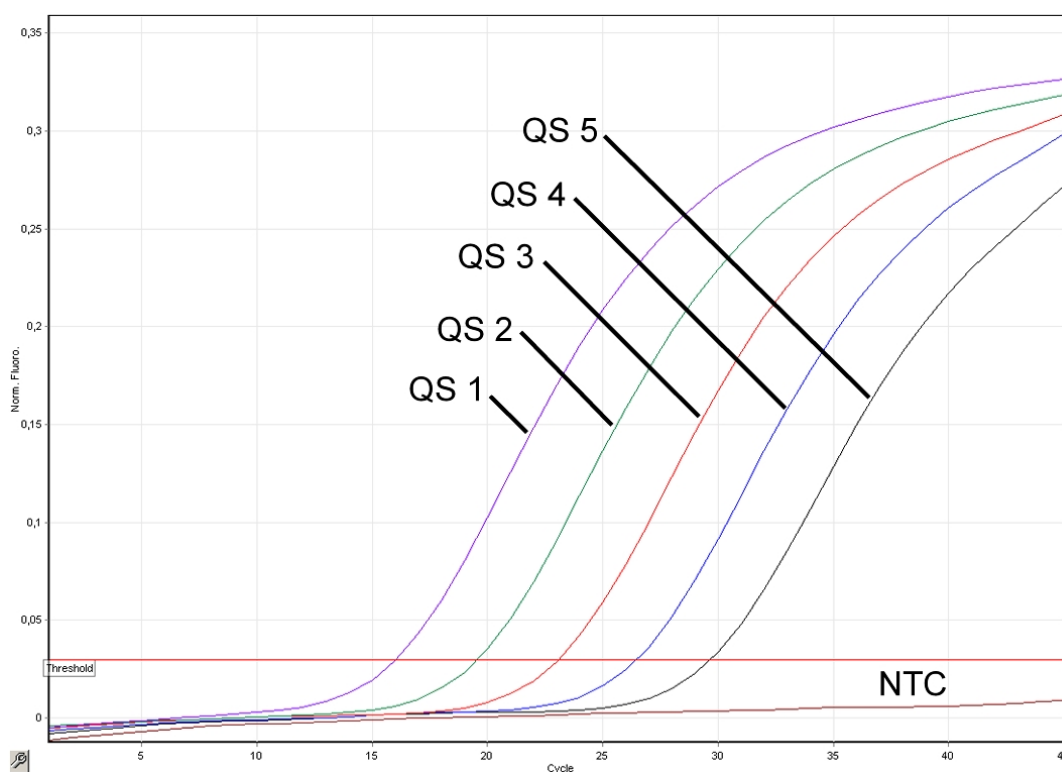


Figura 11. Detecção dos padrões de quantificação (HBV RG/TM QS 1–5) no canal de fluorescência Cycling Green. NTC: nenhum controlo de modelo (controlo negativo).

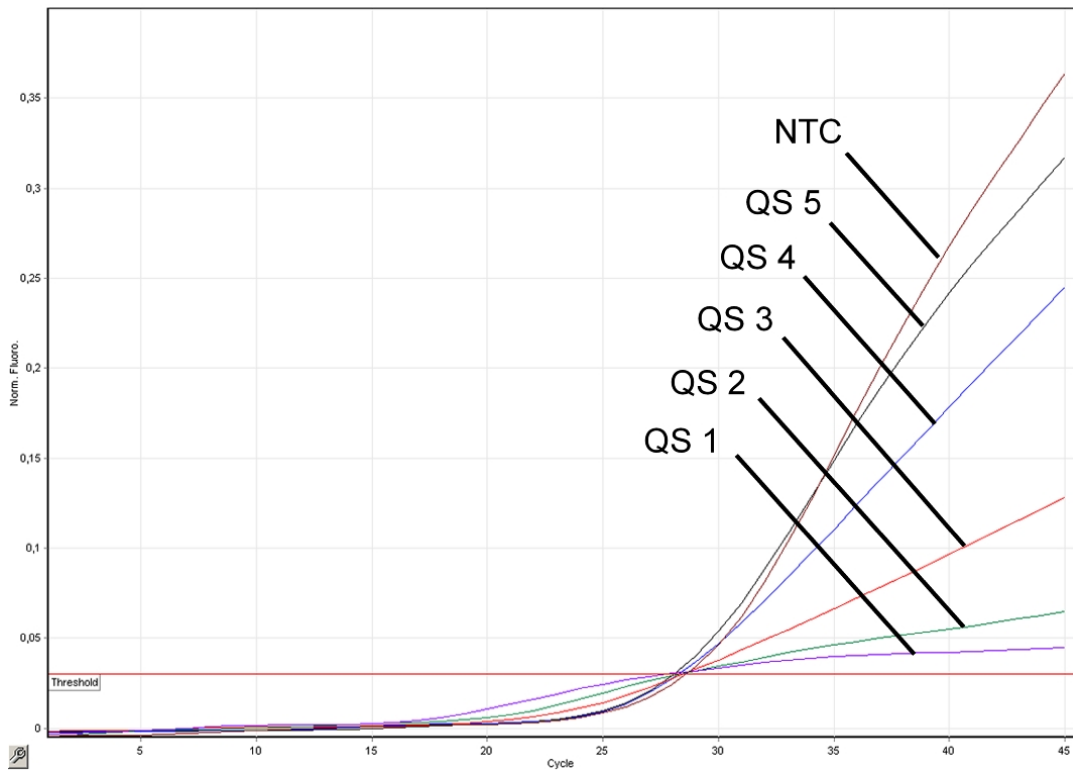






Figura 12. Detecção do controlo interno (IC) no canal de fluorescência Cycling Yellow com amplificação simultânea dos padrões de quantificação (HBV RG/TM QS 1–5). NTC: nenhum controlo de modelo (controlo negativo).

Guia para a 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 deste 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

Ausência de sinal com controlos positivos (HBV RG/TM QS 1–5) no canal de fluorescência Cycling Green ou Cycling A.FAM

- | | |
|--|---|
| a) O canal de fluorescência selecionado para análise dos dados de PCR não cumpre o protocolo |  Para análise de dados, selecione o canal de fluorescência Cycling Green ou Cycling A.FAM para a PCR de VHB analítica e o canal de fluorescência Cycling Yellow ou Cycling A.JOE para a PCR do controlo interno. |
| b) Programação incorreta do perfil de temperatura do instrumento Rotor-Gene |  Comparar o perfil de temperatura com o protocolo. Ver “Protocolo: PCR e análise de dados”, pág. 26. |
| c) Configuração incorreta da PCR |  Rever os passos com ajuda do esquema de pipetagem e, se necessário, repetir a PCR. Ver “Protocolo: PCR e análise de dados”, pág. 26. |
| d) As condições de armazenamento para um ou mais componentes do kit não cumprem as instruções fornecidas em “Conservação” (página 7) |  Verificar as condições de armazenamento e a data de validade (ver etiqueta do kit) dos reagentes e usar um novo kit, caso seja necessário. |

Comentários e sugestões

- e) O kit *artus* HBV RG PCR expirou
- ⓘ Verificar as condições de armazenamento e a data de validade (ver etiqueta do kit) dos reagentes e usar um novo kit, caso seja necessário.

Sinal fraco ou ausente do controlo interno de uma amostra negativa de plasma sujeita a purificação usando o kit QIAamp DSP Virus ($C_T = 29 \pm 3$; limite, 0,03) no canal de fluorescência Cycling Yellow ou Cycling A.JOE e ausência simultânea de sinal no canal Cycling Green ou Cycling A.FAM

- a) As condições da PCR não cumprem os requisitos do protocolo
- ⓘ Verificar as condições da PCR (ver acima) e repetir a PCR com as definições corrigidas, caso seja necessário.
- b) A PCR foi inibida
- ⓘ Certificar-se de que é utilizado o método de isolamento recomendado e seguir atentamente as instruções do fabricante.
- c) ADN foi perdido durante a extração
- ⓘ Se o controlo interno tiver sido adicionado à extração, a ausência de um sinal de controlo interno pode indicar a perda de ADN durante a extração. Certificar-se de que é utilizado o método de isolamento recomendado (ver "Isolamento de ADN", página 23) e seguir atentamente as instruções do fabricante.
- d) As condições de armazenamento para um ou mais componentes do kit não cumprem as instruções fornecidas em "Conservação" (página 7)
- ⓘ Verificar as condições de armazenamento e a data de validade (ver etiqueta do kit) dos reagentes e usar um novo kit, caso seja necessário.
- e) O kit *artus* HBV RG PCR expirou
- ⓘ Verificar as condições de armazenamento e a data de validade (ver etiqueta do kit) dos reagentes e usar um novo kit, caso seja necessário.

Comentários e sugestões

Sinais com controlos negativos no canal de fluorescência Cycling Green ou Cycling A.FAM da PCR analítica

a) Contaminação ocorrida durante a preparação da PCR

ⓘ Repetir a PCR com novos reagentes nos replicados.

ⓘ Se possível, fechar os tubos de PCR diretamente após adicionar a amostra a ser testada.

ⓘ Certificar-se de que pipeta o controlo positivo sempre no fim.

ⓘ Assegurar que o espaço de trabalho e os instrumentos são descontaminados regularmente.

b) Contaminação ocorrida durante a extração

ⓘ Repetir a extração e a PCR da amostra a ser testada usando novos reagentes.

ⓘ Assegurar que o espaço de trabalho e os instrumentos são descontaminados regularmente.

Referências

A QIAGEN mantém uma abrangente base de dados online atualizada de publicações científicas que utilizam produtos QIAGEN. As opções de pesquisa avançada permitem localizar os artigos necessários, 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, visitar a base de dados de referências da QIAGEN online em www.qiagen.com/RefDB/search.asp ou contactar a Assistência Técnica ou o distribuidor local da QIAGEN.

Informações para encomenda

Produto	Índice	N.º de cat.
<i>artus</i> HBV RG PCR Kit (24)	Para 24 reações: Master, 5 padrões de quantificação, controlo interno, água (grau PCR)	4506263
<i>artus</i> HBV RG PCR Kit (96)	Para 96 reações: Master, 5 padrões de quantificação, controlo interno, água (grau PCR)	4506265
Kit QIAamp DSP Virus — para purificação de ácidos nucleicos virais de plasma humano para fins de diagnóstico in vitro		
QIAamp DSP Virus Kit	Para 50 preparações: Colunas para Centrifugação QIAamp MinElute®, Reagentes, Tubos, Extensores da Coluna e Conectores de Vácuo	60704
Rotor-Gene Q MDx — para análise da PCR em tempo real validada por em aplicações clínicas		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Ciclador de PCR em tempo real com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Ciclador de PCR em tempo real com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9002033

Produto	Índice	N.º de cat.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9002032
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Instrumento de PCR em tempo real com 6 canais (azul, verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), incluindo computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9002043
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Instrumento de PCR em tempo real com 6 canais (azul, verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), incluindo computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9002042
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Ciclador de PCR em tempo real com 2 canais (verde, amarelo), computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting com 2 canais (verde, amarelo) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9002002

Produto	Índice	N.º de cat.
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting com 2 canais (verde, amarelo) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9002013
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting com 2 canais (verde, amarelo) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9002012
Rotor-Gene Q — para um desempenho superior em PCR em tempo real		
Rotor-Gene Q 5plex System	Ciclador de PCR em tempo real com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Ciclador de PCR em tempo real com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9001570
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9001650

Produto	Índice	N.º de cat.
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9001580
Rotor-Gene Q 6plex System	Instrumento de PCR em tempo real com 6 canais (azul, verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), incluindo computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Instrumento de PCR em tempo real com 6 canais (azul, verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), incluindo computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9001590
Rotor-Gene Q 2plex System	Ciclador de PCR em tempo real com 2 canais (verde, amarelo), computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9001620
Rotor-Gene Q 2plex Platform	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting com 2 canais (verde, amarelo) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9001550

Produto	Índice	N.º de cat.
Rotor-Gene Q 2plex HRM System	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting com 2 canais (verde, amarelo) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9001630
Rotor-Gene Q 2plex HRM Platform	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting com 2 canais (verde, amarelo) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9001560
Acessórios Rotor-Gene Q		
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloco de alumínio para configuração da reação manual com pipeta de um canal em 72 tubos de 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Bloco de alumínio para configuração da reação manual numa variedade padrão de 8 x 12 utilizando 72 tubos de 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 tiras de 4 tubos e tampas para 1000 reações	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos e tampas para 10 000 reações	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 tubos de parede fina para 1000 reações	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 tubos de parede fina para 1000 reações	981008

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

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

Marcas registadas: QIAGEN®, QIAamp®, artus®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); COBAS®, TaqMan® (Roche Group); FAM™, JOE™, SYBR® (Life Technologies Corporation).

O kit artus HBV RG PCR e o kit QIAamp DSP Virus são kits de diagnóstico com a marca CE, de acordo com a diretiva europeia 98/79/CE para Diagnóstico In Vitro. Não disponível em todos os países.

Acordo de licença limitada

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

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

Para obter os termos de licença atualizados, ver 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 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

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

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

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

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

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

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

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

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

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

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

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

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

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

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

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

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

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

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

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

