

Manual do kit *artus*[®] BK Virus RG PCR

 24 (n.º de catálogo 4514263)
 96 (n.º de catálogo 4514265)

Versão 1



Diagnóstico in vitro quantitativo

Para utilização com instrumentos Rotor-Gene[®] Q



4514263, 4514265



1056823PT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden.

ALEMANHA

R4

MAT

1056823PT



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

Utilização prevista	7
Sumário e explicação	7
Informação sobre o agente patogénico	7
Princípio do procedimento	8
Materiais fornecidos	8
Conteúdo do kit	8
Materiais necessários, mas não fornecidos	9
Avisos e precauções	9
Precauções gerais	10
Armazenamento e manuseamento de reagentes	10
Procedimento	11
Isolamento de ADN	11
Controlo interno	11
Protocolo	
■ PCR e análise de dados	13
Interpretação de resultados	20
Quantificação	20
Resultados	21
Guia de resolução de problemas	22
Controlo da qualidade	24
Limitações	24
Características de desempenho	25
Sensibilidade analítica	25
Especificidade	25
Precisão	27
Robustez	28
Reprodutibilidade	29
Avaliação diagnóstica	29
Referências	29
Símbolos	29
Informações de contacto	30

Utilização prevista

O kit *artus* BK Virus PCR é um teste de amplificação de ácidos nucleicos in vitro, para a quantificação de ADN do vírus BK (BKV) em amostras biológicas humanas. 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.

Nota: O kit *artus* BK Virus RG PCR não pode ser usado com instrumentos Rotor-Gene Q 2plex.

Sumário e explicação

O kit *artus* BK Virus RG PCR é um sistema pronto a utilizar para a deteção de ADN do vírus BK através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em instrumentos Rotor-Gene Q. O BK Virus RG Master contém reagentes e enzimas para a amplificação específica de uma região de 274 pb do genoma do vírus BK e para a deteção direta de fragmentos amplificados no canal de fluorescência Cycling Green do Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene 6000.

Ao mesmo tempo, o kit *artus* BK Virus 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 Orange do Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene 6000. O limite de deteção da PCR analítica do vírus BK não é reduzido (ver "Sensibilidade analítica", página 25). São fornecidos controlos positivos externos (BK Virus RG QS 1–4) que permitem a determinação da quantidade de ADN viral. Para mais informações, consulte "Interpretação de resultados", na página 20.

Informação sobre o agente patogénico

O vírus BK (BKV) é um vírus de ADN pertencente aos poliomavírus. A infeção primária costuma ocorrer sobretudo na infância e é, regra geral, assintomática. A seroprevalência em adultos chega aos 90 %. Depois da infeção primária, o BKV continua latente nas células do rim e pode ser reativado em situações de imunodeficiência, como um transplante.

A infeção BKV pode ser correlacionada com a nefrite tubulointersticial e com a estenose uretral em recetores de transplante renal, bem como a cistite hemorrágica em recetores de transplante de medula óssea. Também tem sido associada a padrões de doença de vasculopatia, pneumonite, encefalite, retinite e até à falência múltipla de órgãos.

Replicações BKV de alto nível persistentes são a característica típica da nefropatia associada ao poliomavírus (PAN) em doentes transplantados renais.

As infeções clinicamente relevantes costumam estar limitadas a indivíduos imunossuprimidos.

Princípio do procedimento

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 durante o ensaio de PCR (ou seja, em tempo real) permite a deteção e quantificação do produto que se acumula sem ter de reabrir os tubos de reação após o ensaio de PCR.*

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

artus BK Virus RG PCR Kit			(24)	(96)
N.º de catálogo			4514263	4514265
Número de reações			24	96
Azul	BK Virus RG Master		2 x 12 reações	8 x 12 reações
Amarelo	BK Virus RG Mg-Sol [†]	Mg-Sol	400 µl	400 µl
Vermelho	BK Virus RG QS 1 [‡] (1 x 10 ⁴ cópias/µl)	QS	200 µl	200 µl
Vermelho	BK Virus RG QS2 [‡] (1 x 10 ³ cópias/µl)	QS	200 µl	200 µl
Vermelho	BK Virus RG QS3 [‡] (1 x 10 ² cópias/µl)	QS	200 µl	200 µl
Vermelho	BK Virus RG QS4 [‡] (1 x 10 ¹ cópias/µl)	QS	200 µl	200 µl
Verde	BK Virus RG IC [§]	IC	1000 µl	2 x 1000 µl
Branco	Água (grau PCR)		1000 µl	1000 µl
	Manual		1	1

[†] Solução de magnésio.

‡ Padrão de quantificação.

§ Controlo interno.

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

Materiais necessários, mas 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.

Reagentes

- Kit de isolamento de ADN (ver “Isolamento de ADN”, página 11)

Consumíveis

- Pontas de pipetas estéreis com filtros
- 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)

Equipamento

- Pipetas (ajustáveis)*
- Misturador vórtex*
- Centrífuga de bancada* com rotor para tubos de ensaio de 2 ml
- Instrumento Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene*† com canais de fluorescência para Cycling Green e Cycling Orange
- Software Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q, versão 1.7.94 ou posterior (software Rotor-Gene 6000, versão 1.7.65)
- 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)

Avisos e precauções

Para utilização em diagnóstico in vitro

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.

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

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

Precauções gerais

O 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).

Armazenamento e manuseamento de reagentes

Os componentes do kit *artus* BK Virus PCR devem ser conservados entre –15 °C e –30 °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 °C não pode exceder um período de 5 horas.

Procedimento

Isolamento de ADN

O kit EZ1 DSP Virus (QIAGEN, n.º cat. 62724)* está validado para purificação de ácido nucleico viral obtido de plasma humano ou urina, para utilização com o kit *artus* BK Virus RG PCR. Realizar a purificação de ADN viral em conformidade com as instruções constantes do *Manual do Kit EZ1 DSP Virus*, com um volume de amostra inicial de 400 µl.

Nota: O kit *artus* BK Virus RG PCR não deve ser usado com métodos de isolamento baseados em fenol.

Nota: A adição de ARN transportador é de grande importância para a eficiência e, com isso, para o rendimento do ADN/ARN. Adicionar a quantidade adequada de transportador de ARN a cada extração seguindo as instruções no *Manual do kit EZ1 DSP Virus*.

Nota: O controlo interno do kit *artus* BK Virus RG PCR pode ser utilizado diretamente no procedimento de isolamento (ver “Controlo interno”, página 11).

Nota: Recomendamos veemente que sejam utilizados ácidos nucleicos virais purificados para a PCR imediatamente após a extração utilizando o Kit EZ1 DSP Virus. Em alternativa, os eluatos podem ser armazenados durante até 3 dias a 4 °C antes da análise da PCR.

Controlo interno

É fornecido um controlo interno (BK Virus RG 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. Ao utilizar, por exemplo, o kit EZ1 DSP Virus, se os ácidos nucleicos virais forem eluídos em 60 µl de tampão de eluição (AVE), então adicionar inicialmente 6 µl de controlo interno.

Nota: O controlo interno e ARN transportador (ver “Isolamento de ADN”, página 11) 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).

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

* O kit EZ1 DSP Virus encontra-se também disponível como kit EASYartus® BK Virus RG PCR com a marca CE-IVD, em conjunto com o kit *artus* BK Virus RG PCR (ver a página 31 para informações de encomendas).

O controlo interno pode ser utilizado, opcionalmente, exclusivamente para verificar uma possível inibição da PCR. Para esta aplicação, adicionar o controlo interno diretamente à mistura de BK Virus RG Master e BK Virus RG Mg-Sol, tal como descrito no passo 2b do protocolo (página 14).

Protocolo: PCR e análise de dados

Pontos importantes antes de iniciar o procedimento

- Familiarizar-se com o instrumento 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, utilizar os 4 padrões de quantificação fornecidos (BK Virus RG QS 1–4) 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 11). Neste caso, preparar uma master mix de acordo com a tabela 1.**

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

Tabela 1. 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
BK Virus RG Master	7 μ l	84 μ l
BK Virus RG Mg-Sol	3 μ l	36 μ l
BK Virus RG IC	0 μ l	0 μ l
Volume total	10 μl	120 μl

- 2b. O controlo interno tem de ser adicionado diretamente à mistura de BK Virus RG Master e BK Virus RG Mg-Sol. Neste caso, preparar uma master mix de acordo com a tabela 2.**

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

Tabela 2. Preparação da master mix (controlo interno utilizado exclusivamente para monitorizar a inibição da PCR)

Número de amostras	1	12
BK Virus RG Master	7 μ l	84 μ l
BK Virus RG Mg-Sol	3 μ l	36 μ l
BK Virus RG IC	1,5 μ l	18 μ l
Volume total	11,5 μl*	138 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 10 μ l da master mix para cada tubo de PCR. De seguida, adicionar 15 μ l de ADN da amostra eluída (ver a tabela 3). Da mesma forma, deverão ser utilizados 15 μ l de, pelo menos, um dos padrões de quantificação (BK Virus RG QS 1–4) como controlo positivo e 15 μ l de água (água, grau de PCR) como um controlo negativo.**

Tabela 3. Preparação do ensaio por PCR

Número de amostras	1	12
Master mix	10 μ l	10 μ l cada
Amostra	15 μ l	15 μ l cada
Volume total	25 μl	25 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 a corrida.**
5. **Para a detecção de ADN do vírus BK, crie um perfil de temperatura de acordo com os passos a seguir indicados.**

Definição dos parâmetros de ensaio gerais	Figuras 1, 2, 3
Ativação inicial da enzima de começo quente	Figura 4
Amplificação do ADN	Figura 5
Ajustar a sensibilidade do canal de fluorescência	Figura 6
Iniciar o ensaio	Figura 7

Todas as especificações referem-se ao software Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q versão 1.7.94 e Rotor--Gene 6000 versão 1.7.65. 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.

6. Primeiro, começar por abrir a caixa de diálogo “New Run Wizard” (Assistente de novo ensaio) (figura 1). Marcar a caixa “Locking Ring Attached” (Anel bloqueador conectado) e clicar em “Next” (Seguinte).

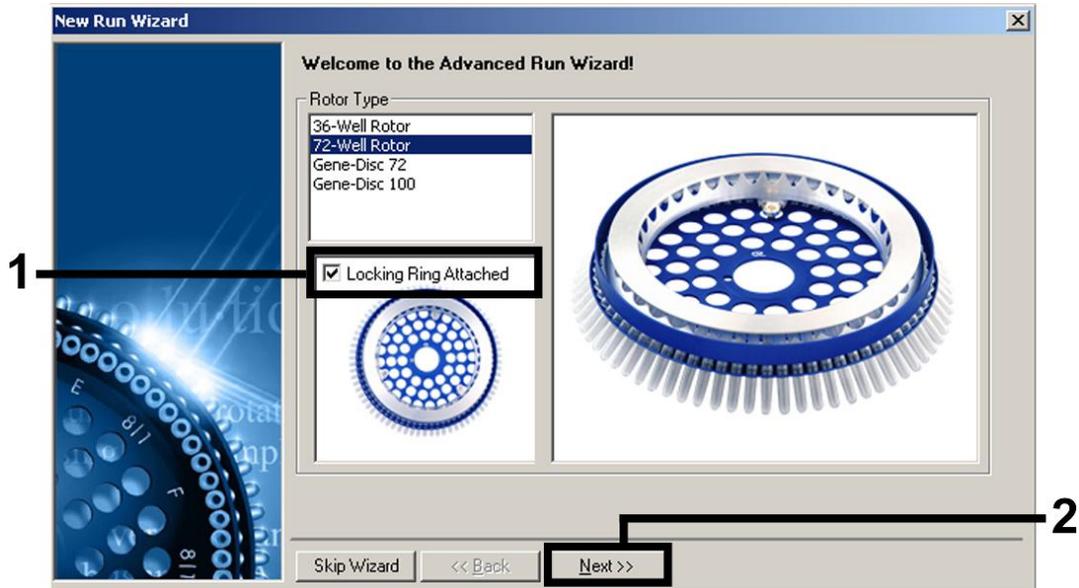


Figura 1. A caixa de diálogo “New Run Wizard”.

7. Selecionar 50 para o volume de reação da PCR e clicar em “Next” (figura 2).

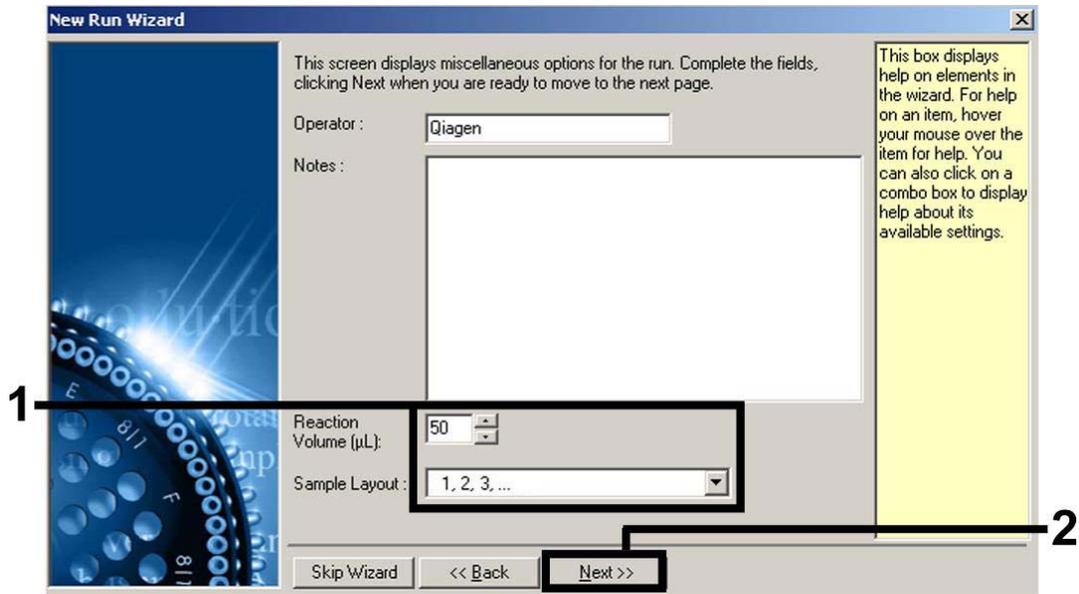


Figura 2. Definição dos parâmetros de ensaio gerais.

Nota: Apesar de o volume de reação física ser 25 µl, selecione sempre 50 para o volume de reação no software Rotor-Gene.

8. Clicar no botão "Edit Profile" (Editar perfil) na caixa de diálogo seguinte do "New Run Wizard" (figura 3) e programar o perfil de temperatura conforme se mostra nas figuras 3-5).

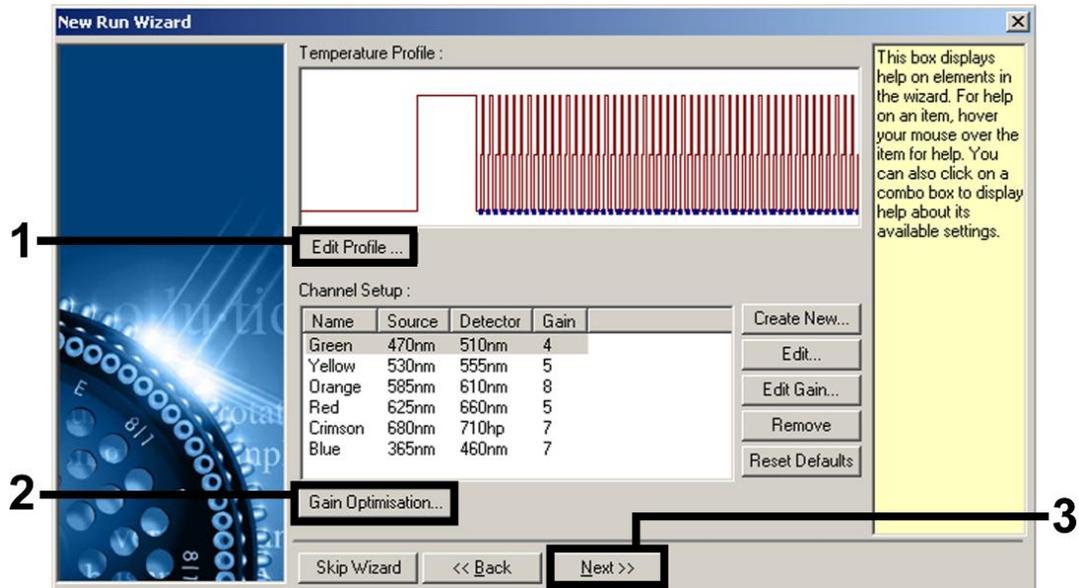


Figura 3. Edição do perfil.

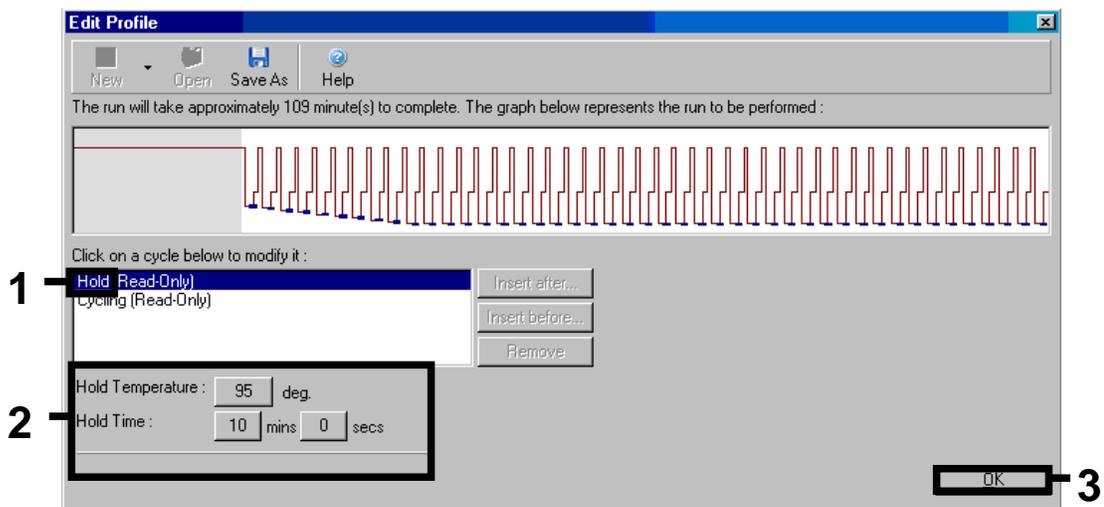


Figura 4. Ativação inicial da enzima de começo quente.

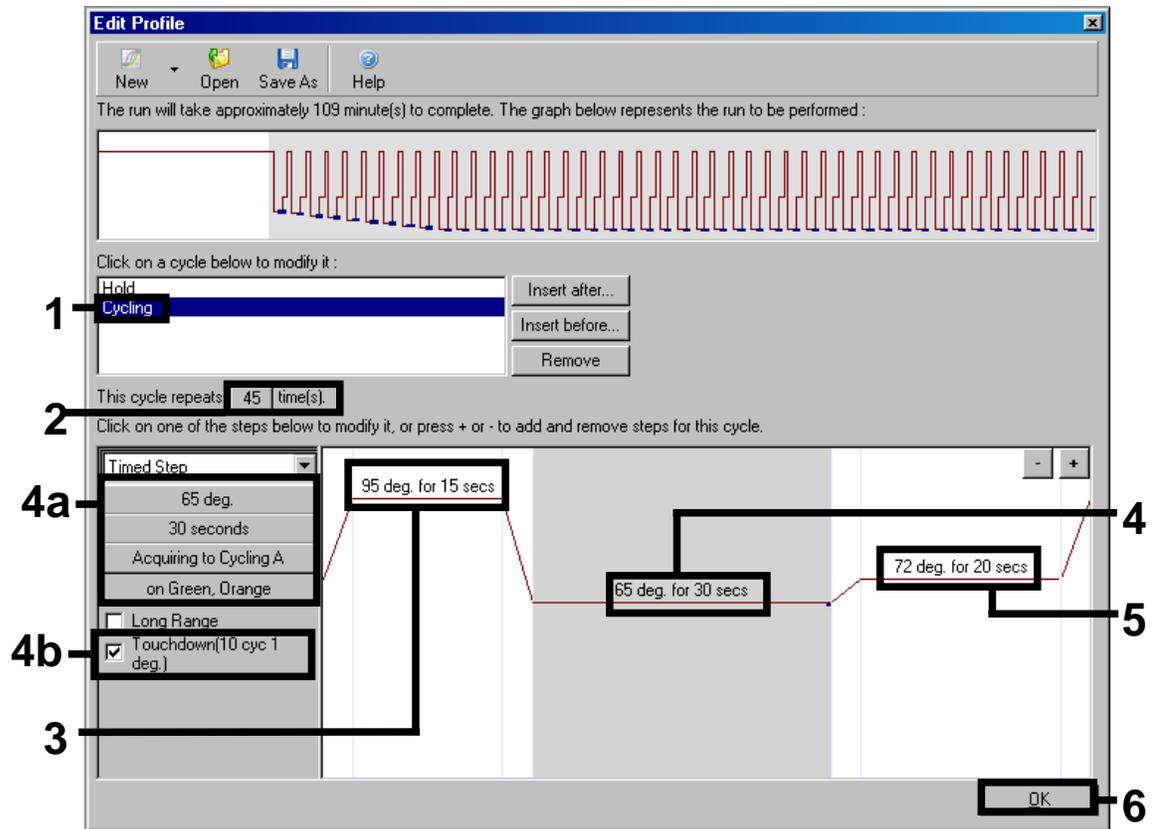


Figura 5. Amplificação do ADN. Ativar sempre a função "Touchdown" (diminuição de um grau a cada ciclo) para 10 ciclos no passo de "Annealing" (Anelamento).

9. O intervalo de detecção dos canais de fluorescência tem de ser determinado 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 3) para abrir a caixa de diálogo "Auto-Gain Optimisation Setup" (Configuração da otimização automática de ganho). Definir a temperatura de calibração para 65 para igualar a temperatura de hibridização do programa de amplificação (figura 6).

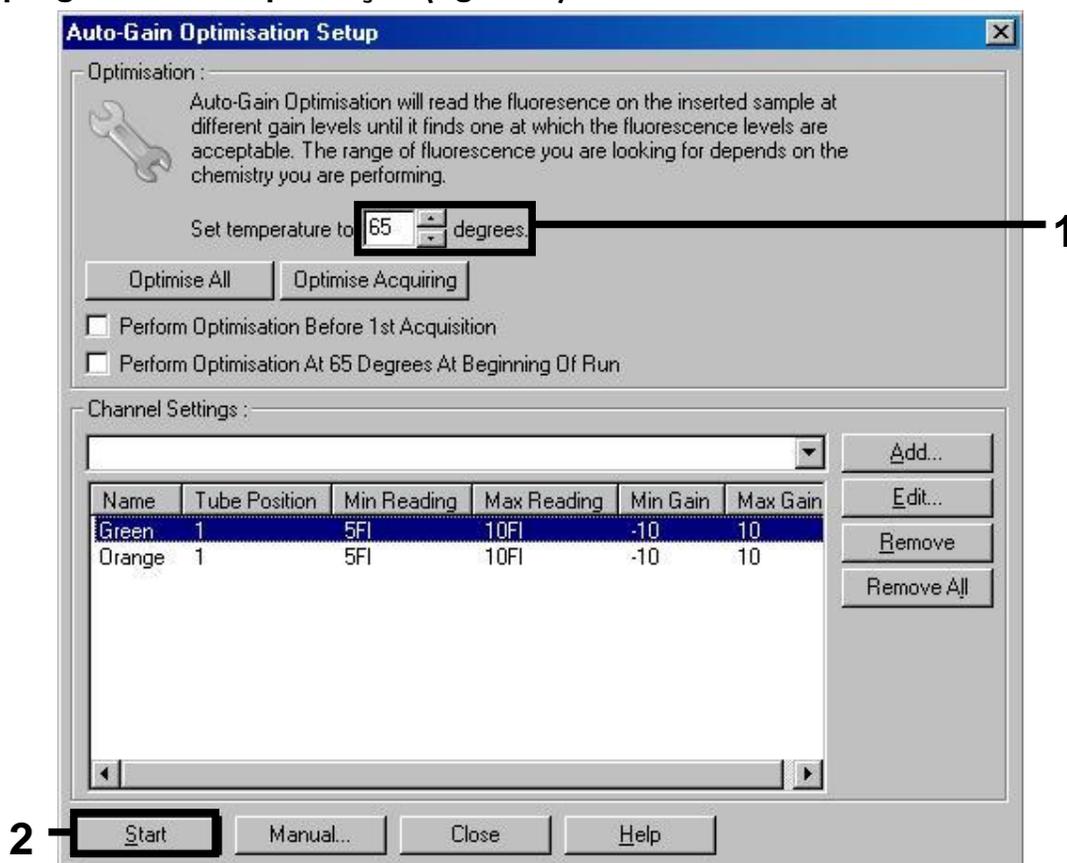


Figura 6. Ajustar a sensibilidade do canal de fluorescência.

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 7). Clique em “Start Run” (Iniciar ensaio).

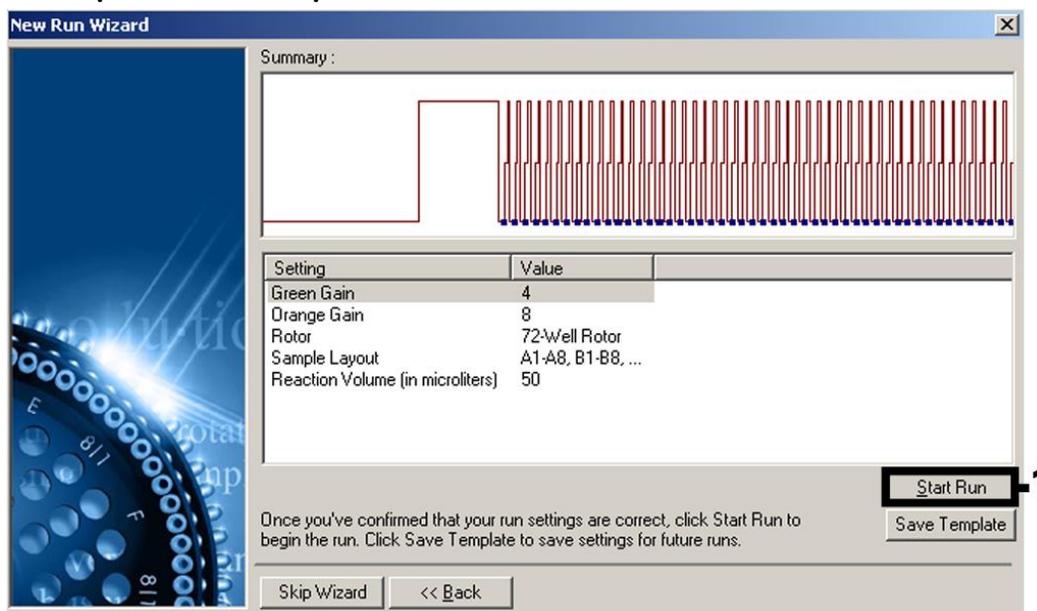


Figura 7. Iniciar o ensaio.

Interpretação de resultados

Quantificação

Os padrões de quantificação fornecidos (BK Virus RG QS 1–4) são tratados como amostras previamente purificadas e utilizados no mesmo volume (15 μ l). Para gerar uma curva padrão nos instrumentos Rotor-Gene Q, todos os 4 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).

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

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

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).

Resultados

A figura 8 e a figura 9 apresentam exemplos de reações de PCR positivas e negativas.

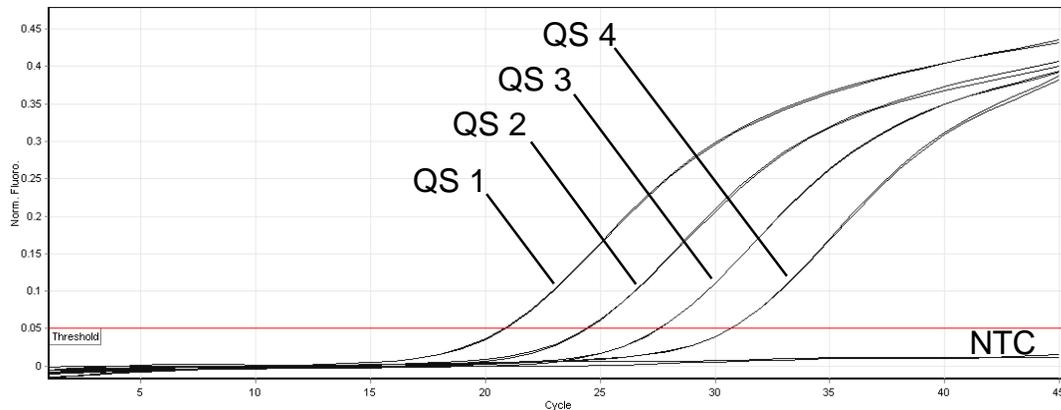


Figura 8. Detecção dos padrões de quantificação (BK Virus RG QS 1–4) no canal de fluorescência Cycling Green. NTC: nenhum controle de modelo (controlo negativo).

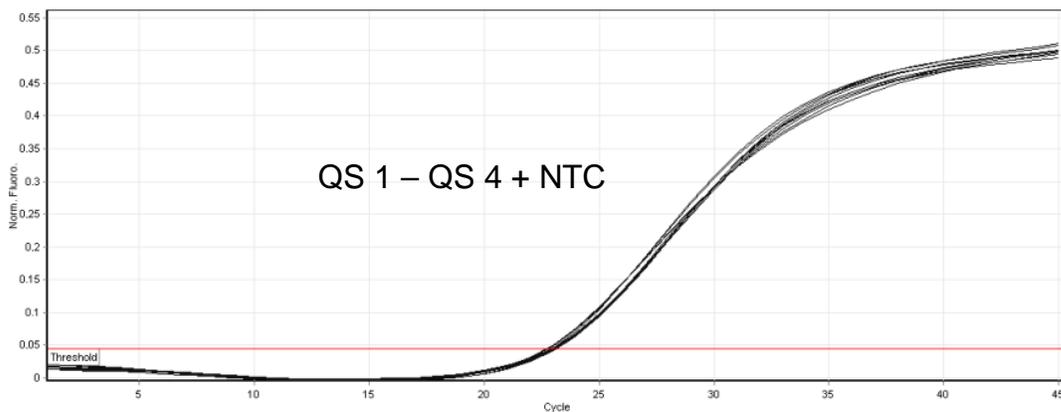


Figura 9. Detecção do controle interno (IC) no canal de fluorescência Cycling Orange com amplificação simultânea dos padrões de quantificação (BK Virus RG QS 1–4). NTC: Nenhum controle de modelo (controlo negativo).

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

Neste caso, é dispensável a deteção de um sinal do canal Cycling Orange, dado que as concentrações iniciais de ADN do vírus BK (sinal positivo no canal Cycling Green) podem levar a um sinal de fluorescência reduzido ou ausente do controle interno no canal Cycling Orange (concorrência).

Não é detetado sinal no canal de fluorescência Cycling Green (ciclo verde). Ao mesmo tempo, aparece um sinal do controlo interno no canal Cycling Orange.

Não é detetável ADN de vírus BK na amostra. Pode ser considerada negativa.

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

**Não é detetado sinal nos canais Cycling Green ou Cycling Orange.
Não pode inferir-se qualquer resultado.**

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

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 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 (BK Virus RG QS 1–4) no canal de fluorescência Cycling Green

- | | |
|--|--|
| 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 para a PCR de vírus BK analítica e o canal de fluorescência Cycling Orange 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”, página 13. |
| 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”, página 13. |

Comentários e sugestões

- d) As condições de armazenamento para um ou mais componentes do kit não cumprem as instruções fornecidas em “Armazenamento e manuseamento de reagentes” (página 10) 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* BK Virus 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 de plasma ou urina negativa sujeita a purificação usando o kit *artus* BK Virus RG PCR no canal de fluorescência Cycling Orange e ausência simultânea de sinal no canal Cycling Green

- 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 11) 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 “Armazenamento e manuseamento de reagentes” (página 10) 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* BK Virus 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.

Sinais com controlos negativos no canal de fluorescência Cycling Green 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.

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* BK Virus RG PCR são testados face a especificações predeterminadas para garantir uma qualidade constante do produto.

Limitações

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 ótimos, 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 detectar a presença do vírus. A validade e o desempenho do ensaio são revistos regularmente.

Características de desempenho

Sensibilidade analítica

Para determinar a sensibilidade analítica do kit *artus* BK Virus RG PCR, foi criada uma série de diluições padrões de 10 a aproximadamente 0,001 equivalentes de cópias/ μ l, tendo sido, em seguida, analisada com o kit *artus* BK Virus RG PCR em instrumentos Rotor-Gene 6000. As análises foram efetuadas em 3 dias diferentes em 8 replicações. Os resultados foram apurados com a ajuda de uma análise de probit. A figura 10 apresenta uma ilustração gráfica da análise de probit no Rotor-Gene 6000. O limite de detecção analítica do kit *artus* BK Virus RG PCR em conjunto com o Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 é 0,195 cópias/ μ l ($p = 0,05$). Isto significa que existe uma probabilidade de 95% de o limite de 0,195 cópias/ μ l ser detectado.

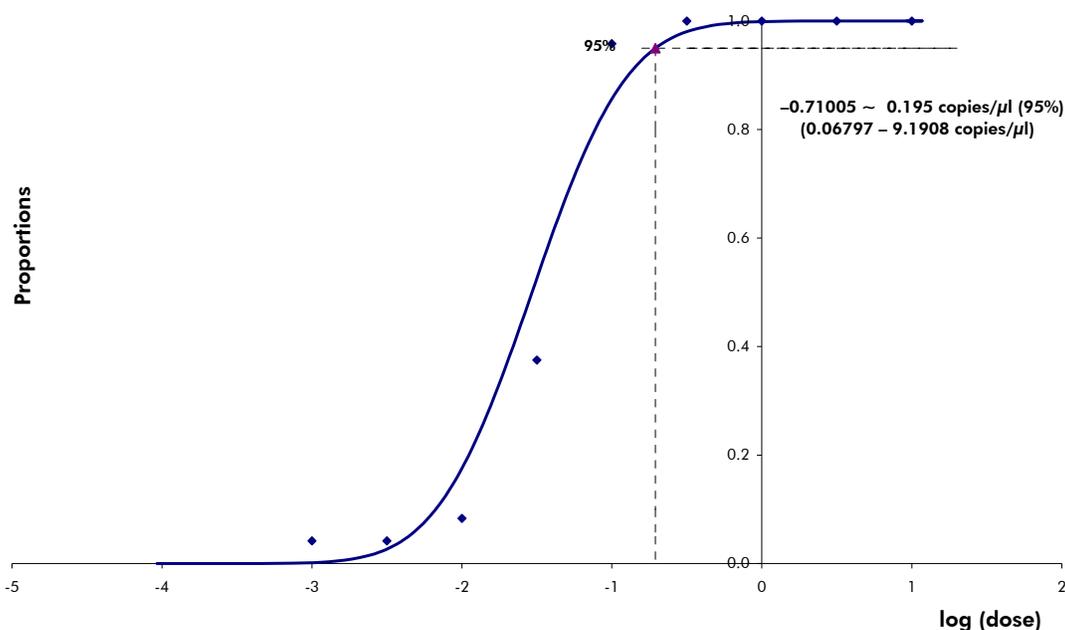


Figura 10. Análise de probit: BK Vírus (Rotor-Gene 6000). Sensibilidade analítica do kit *artus* BK Virus RG PCR no Rotor-Gene 6000.

Especificidade

A especificidade do kit *artus* BK Virus 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 mediante uma análise de comparação de sequência quanto a eventuais homologias com todas as sequências publicadas em bancos de genes. A detetabilidade de todas as estirpes relevantes foi assim assegurada por um alinhamento da base de dados e por um ensaio de PCR nos instrumentos Rotor-Gene com as seguintes estirpes (ver a tabela 4).

Tabela 4. Testes de especificidade das estirpes relevantes

Vírus	Estirpe	Fonte	BK Virus (Cycling Green)	Controlo interno (Cycling Orange)
BK vírus	Dunlop	ATCC*	+	+
BK vírus	Gardner	ATCC	+	+
BK vírus	AB269822	Geneart	+	+
BK vírus	S72390	Geneart	+	+

* American Type Culture Collection.

Além disso, a especificidade foi validada com 30 amostras diferentes de plasma negativo para vírus BK. Estas não geraram quaisquer sinais com os primers e sondas específicos do vírus BK que estão incluídos no BK Virus RG Master (solução padrão).

Foi também testada a possibilidade de reações cruzadas do kit *artus* BK Virus RG PCR usando o grupo de controlo listado na tabela 5. Nenhum dos agentes patogénicos testados era reativo. Em infeções mistas, não ocorrem reações cruzadas.

Tabela 5. Testes de especificidade do kit com agentes patogénicos com potencial de reação cruzada

Grupo de controlo	BK virus (Cycling Green)	Controlo interno (Cycling Orange)
Citomegalovírus	–	+
Vírus Epstein-Barr	–	+
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 do herpes humano 6	–	+
Vírus JC	–	+
Vírus símio 40	–	+
<i>Candida albicans</i>	–	+

Precisão

Os dados de precisão do kit *artus* BK Virus RG PCR foram recolhidos através de instrumentos Rotor-Gene e permitem determinar a 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 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* BK Virus RG PCR foram recolhidos utilizando o padrão de quantificação com a menor concentração (QS 4; 1×10^1 cópias/ μ l). O teste foi realizado com 8 replicações. Os dados de precisão foram calculados com base nos valores de C_T das curvas de amplificação (C_T : ciclo limite, ver tabela 6). Tendo por base estes resultados, a dispersão estatística global de uma dada amostra com a concentração referida é de

2,11% (C_T), e 3,59% (C_T) para a detecção do controlo interno. Estes valores baseiam-se na totalidade de todos os valores individuais das variabilidades determinadas.

Tabela 6. Dados de precisão com base nos valores de C_T

	Valor C_T	Desvio-padrão	Coefficiente de variação (%)
Variabilidade intra-ensaio: BK Virus RG QS 4	29,45	0,17	0,56
Variabilidade intra-ensaio: Controlo interno	24,31	0,12	0,49
Variabilidade entre ensaios: BK Virus RG QS 4	29,42	0,25	0,85
Variabilidade entre ensaios: Controlo interno	23,30	0,77	3,30
Variabilidade entre lotes: BK Virus RG QS 4	30,31	0,64	2,10
Variabilidade entre lotes: Controlo interno	22,53	0,40	1,78
Variância total: BK Virus RG QS 4	29,80	0,63	2,11
Variância total: Controlo interno	23,12	0,83	3,59

Robustez

A verificação da robustez permite apurar a taxa total de erro do kit *artus* BK Virus RG PCR. Para isso, foram misturadas 30 amostras negativas para o vírus BK com 1 cópia/ μ l por volume de eluição de ADN de controlo de vírus BK (cinco vezes a concentração dos limites de sensibilidade analíticos). Após a extração utilizando o kit EZ1[®] DSP Virus (ver “Isolamento de ADN”, página 11), estas amostras foram analisadas com o kit *artus* BK Virus RG PCR. A taxa de

erro para todas as 30 amostras foi de 0%. Adicionalmente, a robustez do controlo interno foi avaliada por purificação e análise das 30 amostras negativas de vírus BK. A taxa total de erro foi de 0%. Não foram observadas inibições. Deste modo, a robustez do kit *artus* BK Virus RG PCR é de $\geq 99\%$.

Reprodutibilidade

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

Avaliação diagnóstica

Atualmente, o kit *artus* BK Virus RG PCR está a ser submetido a uma série de estudos de avaliação.

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.

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

Informações de contacto

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

Informações para encomenda

Produto	Índice	N.º de cat.
<i>artus</i> BK Virus RG PCR Kit (24)	Para 24 reações: Master, 4 padrões de quantificação, controlo interno, solução de magnésio, água (grau PCR)	4514263
<i>artus</i> BK Virus RG PCR Kit (96)	Para 96 reações: Master, 4 padrões de quantificação, controlo interno, solução de magnésio, água (grau PCR)	4514265
Kits EASYartus BK Virus RG PCR — para a purificação totalmente automatizada e integrada de amostra em conformidade com a CE-IVD e deteção de agentes patogénicos		
EASYartus BK Virus RG PCR Kit 1	Para 48 preparações de ácidos nucleicos virais e 24 ensaios: 1 x kit EZ1 DSP Virus, 1 x kit <i>artus</i> BK Virus RG PCR (24)	EA11423
EASYartus BK Virus RG PCR Kit 2	Para 48 preparações de ácidos nucleicos virais e 48 ensaios: 1 x kit EZ1 DSP Virus, 2 x kit <i>artus</i> BK Virus RG PCR (24)	EA11424
Kit EZ1 DSP Virus — para a purificação automatizada e simultânea de ADN viral e ARN de 1–14 amostras de plasma humano, soro ou LCR		
EZ1 DSP Virus Kit (48)	Para 48 preparações de ácidos nucleicos virais: Cartuchos de reagentes enchidos previamente, porta-pontas descartáveis, pontas com filtros descartáveis, tubos de amostra, tubos de eluição, tampões, ARN transportador	62724
Rotor-Gene Q MDx e acessórios		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Ciclador de PCR em tempo real com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9002022

Produto	Índice	N.º de cat.
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Ciclador de PCR em tempo real com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9002023
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: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9002032
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: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9002033
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 6plex System	Instrumento de PCR em tempo real com 6 canais (azul, verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), incluindo computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9002043
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

Produto	Índice	N.º de cat.
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Bloco de alumínio para configuração da reação manual numa variedade padrão de 8 x 12 utilizando 96 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 10 000 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.

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 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®, artus®, EASYartus®, EZ1®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group).

Acordo de licença limitada

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

1. O kit *artus BK Virus RG PCR* pode ser usado somente de acordo com o *Manual do kit BK Virus RG PCR* e apenas para utilização 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 BK Virus 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)

