


# Manual do Kit *artus*<sup>®</sup> CMV LC PCR

 24 (n.º de catálogo 4503063)

 96 (n.º de catálogo 4503065)

Diagnóstico in vitro quantitativo

Para utilização com o instrumento

*LightCycler*<sup>®</sup> 1.1/1.2/1.5 e *LightCycler* 2.0

Dezembro de 2014 — Versão 1



4503063, 4503065



1046903PT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R4

**MAT**

1046903PT



## **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 mais informações, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).**

# Índice

<b>1. Conteúdo</b>	<b>5</b>
<b>2. Conservação</b>	<b>5</b>
<b>3. Materiais e dispositivos adicionais necessários</b>	<b>6</b>
<b>4. Medidas gerais de segurança</b>	<b>6</b>
<b>5. Informações acerca do agente patogénico</b>	<b>8</b>
<b>6. Princípio da PCR em tempo real</b>	<b>8</b>
<b>7. Descrição do produto</b>	<b>8</b>
<b>8. Protocolo</b>	<b>10</b>
8.1 Pré-analítica: Colheita, conservação e transporte de amostras	10
8.1.1 Colheita de amostras	11
8.1.2 Conservação de amostras	11
8.1.3 Transporte de amostras	11
8.1.4 Substâncias interferentes	12
8.2 Isolamento de ADN	12
8.3 Controlo interno	13
8.4 Quantificação	15
8.5 Preparação da PCR	16
8.6 Programação dos instrumentos <i>LightCycler</i>	22
8.6.1 Programação do instrumento <i>LightCycler 1.1/1.2/1.5</i>	22
8.6.2 Programação do instrumento <i>LightCycler 2.0</i>	25
<b>9. Análise de dados</b>	<b>29</b>
9.1 Análise de dados dos dados de PCR no instrumento <i>LightCycler 1.1/1.2/1.5</i>	29
9.2 Análise de dados dos dados de PCR no instrumento <i>LightCycler 2.0</i>	32

<b>10. Resolução de problemas</b> .....	<b>36</b>
<b>11. Especificações</b> .....	<b>38</b>
11.1 Sensibilidade analítica .....	38
11.2 Especificidade .....	41
11.3 Precisão .....	42
11.4 Robustez .....	44
11.5 Reprodutibilidade.....	44
11.6 Avaliação diagnóstica .....	45
<b>12. Limitações da utilização do produto</b> .....	<b>47</b>
<b>13. Informações de segurança</b> .....	<b>47</b>
<b>14. Controlo de qualidade</b> .....	<b>47</b>
<b>15. Referências</b> .....	<b>48</b>
<b>16. Explicação dos símbolos</b> .....	<b>49</b>

## Kit *artus* CMV LC PCR

Para utilização com o Instrumento *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ou *LightCycler 2.0* para a deteção quantitativa de ADN do CMV em plasma com EDTA.

### 1. Conteúdo

	Rotulagem e conteúdo	N.º art. 4503063 24 reações	N.º art. 4503065 96 reações
<b>Azul</b>	<i>CMV LC Master</i>	2 x 12 reações	8 x 12 reações
<b>Amarelo</b>	<i>CMV Mg-Sol<sup>ª</sup></i>	1 x 600 µl	1 x 600 µl
<b>Vermelho</b>	<i>CMV QS 1<sup>ª</sup></i> 1 x 10 <sup>4</sup> cópias/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
<b>Vermelho</b>	<i>CMV QS 2<sup>ª</sup></i> 1 x 10 <sup>3</sup> cópias/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
<b>Vermelho</b>	<i>CMV QS 3<sup>ª</sup></i> 1 x 10 <sup>2</sup> cópias/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
<b>Vermelho</b>	<i>CMV QS 4<sup>ª</sup></i> 1 x 10 <sup>1</sup> cópias/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
<b>Verde</b>	<i>CMV LC IC<sup>c</sup></i>	1 x 1000 µl	2 x 1000 µl
<b>Branco</b>	<i>Água (grau PCR)</i>	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl

- ª QS = Padrão de quantificação  
IC = Controlo interno  
Mg-Sol = Solução de magnésio

### 2. Conservação

Os componentes do kit *artus* CMV LC PCR devem ser conservados entre -15 °C e -30 °C e são estáveis até ao prazo de validade impresso no rótulo. A repetida descongelação e congelação (> 2 x) deve ser evitada uma vez que pode reduzir a sensibilidade. Se os reagentes se destinarem a ser usados de forma intermitente, devem ser congelados em alíquotas. Se houver a necessidade de conservar os componentes a +4 °C, não se deve ultrapassar um período de cinco horas.

### 3. Materiais e dispositivos adicionais necessários

- Luvas de laboratório isentas de pó
- Kit de isolamento de ADN (ver **8.2 Isolamento de ADN**)
- Pipetas (ajustáveis)
- Pontas de pipetas estéreis com filtros
- Misturador vórtex
- Centrífuga de mesa com rotor para tubos de reação de 2 ml
- *Color Compensation Set* (Roche Diagnostics, n.º de catálogo 2 158 850) para a instalação de um ficheiro *Crosstalk Color Compensation* para o instrumento *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ou *LightCycler 2.0*
- *LightCycler Multicolor Demo Set* (n.º de catálogo 03 624 854 001) para a instalação de um ficheiro *Crosstalk Color Compensation* para o instrumento *LightCycler 2.0*
- Capilares *LightCycler* (20 µl)
- Bloco de refrigeração *LightCycler*
- Instrumento *LightCycler 1.1/1.2/1.5* (versão de software 3.5) ou *LightCycler 2.0* (versão de software 4.0)
- Ferramenta de colocação de tampas *LightCycler*

### 4. Medidas gerais de segurança

O utilizador deve ter sempre em atenção o seguinte:

- Utilizar pontas de pipetas estéreis com filtros.
- Armazenar e extrair materiais positivos (amostras, controlos 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 antes de dar início a um ensaio.
- De seguida, misturar completamente e centrifugar brevemente os componentes.

- Trabalhar rapidamente em gelo ou num bloco de refrigeração *LightCycler*.

## 5. Informações acerca do agente patogénico

O citomegalovírus humano (CMV) é encontrado no sangue, tecidos e praticamente todos os fluidos corporais de pessoas infetadas. A transmissão pode ocorrer por via oral, sexual, por transfusão sanguínea ou transplantação de órgãos, por via intrauterina ou perinatal. A infeção por CMV é frequentemente uma infeção assintomática, a que se segue um período de latência permanente do vírus no corpo. Caso a infeção seja sintomática, em adolescentes ou em adultos, os sintomas são semelhantes aos da mononucleose infecciosa e incluem febre, hepatite ligeira e indisposição geral. Foram observados vários episódios de infeção por CMV, em particular nos doentes infetados por via intrauterina ou em doentes imunodeficientes.

## 6. Princípio da PCR em tempo real

O diagnóstico 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 (Mackay, 2004).

## 7. Descrição do produto

O kit *artus* CMV LC PCR é um sistema pronto a utilizar para a deteção de ADN do CMV através da reação em cadeia da polimerase (PCR) no instrumento *LightCycler*. O *CMV LC Master* contém reagentes e enzimas para a amplificação específica de uma região de 105 bp do genoma do CMV e para a deteção direta de fragmentos amplificados específicos no instrumento *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ou *LightCycler 2.0*. Ao mesmo tempo, o kit *artus* CMV



LC PCR contém um segundo sistema de amplificação heterólogo para identificar uma possível inibição da PCR.

Produto da PCR	Seleção dos canais de fluorescência	
	Instrumento <i>LightCycler</i> 1.1/1.2/1.5	Instrumento <i>LightCycler</i> 2.0
CMV	F1	530
CMV LC IC	F3/Back-F1	705/Back 530

A amplificação e a deteção deste *controlo interno* (IC) não reduz o limite de deteção da PCR analítica do CMV (ver **11.1 Sensibilidade analítica**). São fornecidos controlos positivos externos (*CMV QS 1–4*) que permitem a determinação da carga de agente patogénico. Para mais informações, ver a secção **8.4 Quantificação**.

**Atenção:** O perfil de temperatura para a deteção do citomegalovírus utilizando o kit *artus* CMV LC PCR corresponde aos perfis do kit *artus* EBV LC PCR, do kit *artus* HSV-1/2 LC PCR e do kit *artus* VZV LC PCR. Por consequência, os ensaios de PCR destes sistemas *artus* podem ser realizados e analisados num único procedimento de ensaio. Ter em atenção as recomendações relativas à análise de PCR fornecidas nos capítulos **8.4 Quantificação** e **9. Análise de dados**.

## 8. Protocolo

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

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

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

A validação do kit *artus* CMV LC PCR foi efetuada usando amostras de plasma humano tratado com EDTA. Não existem outras amostras validadas.

Utilizar apenas os kits de isolamento de ácido nucleico recomendados (ver **8.2 Isolamento de ADN**) para a preparação das amostras.

O uso de determinados materiais obriga ao rigoroso cumprimento de instruções específicas relativas a colheita, transporte e conservação.

### **8.1.1 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 ocorrer 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). Devem ser colhidos de 5 a 10 ml de sangue anticoagulado com EDTA. Inverter os tubos diretamente após colheita da amostra (8 vezes, não agitar).

**Atenção:** Não devem ser usadas amostras de doentes tratados com heparina (ver **8.1.4 Substâncias interferentes**).

### **8.1.2 Conservação de amostras**

O sangue total deve ser separado em componentes celulares e plasma num período de seis horas através de centrifugação durante 20 minutos a 800 – 1600 x g. 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.

### **8.1.3 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 os regulamentos locais e nacionais relativos ao transporte de materiais patogénicos.\*

As amostras devem ser enviadas no prazo de seis 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 da amostra por serviços de correio expresso. As amostras de sangue devem ser enviadas refrigeradas (+2 °C a +8 °C), enquanto que o plasma separado deve ser enviado congelado (-20 °C).

### 8.1.4 Substâncias interferentes

Valores elevados de bilirrubina ( $\leq 4,5$  mg/dl), de lípidos ( $\leq 1100$  mg/dl) e amostras hemolíticas, não influenciam o sistema analítico do CMV. A heparina afeta a PCR. Amostras colhidas em tubos com heparina como anticoagulante não devem ser utilizadas. As amostras de doentes tratados com heparina também não devem ser usadas.

## 8.2 Isolamento de ADN

Os kits de isolamento que se seguem são recomendados para isolar ADN de CMV:

Material de amostra	Kit de isolamento de ácido nucleico	Catálogo Número	Fabricante	ARN transportador
Plasma tratado com EDTA	Kit QIAamp® DSP Virus (50)	60704	QIAGEN	incluído
Plasma tratado com EDTA	Kit EZ1® DSP Virus (48)*	62724	QIAGEN	incluído

\*Para utilização em conjunto com o EZ1 Advanced (n.º de catálogo 9001411) e o Cartão EZ1 Advanced DSP Virus (n.º de catálogo 9018306) ou o BioRobot® EZ1 DSP (n.º de catálogo 9001360) e o Cartão EZ1 DSP Virus (n.º de catálogo 9017707). O kit EZ1 DSP Virus encontra-se também disponível como kits

---

\* International Air Transport Association (Associação Internacional de Transporte Aéreo). Dangerous Goods Regulations, 41st Edition, 2000.704.

EASYartus® CMV LC PCR com a marca CE-IVD, em conjunto com o kit *artus* CMV LC PCR (n.º de catálogo EA10303 e EA10304).

- 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 e o kit EZ1 DSP Virus, deverão ser seguidas as indicações sobre o manuseamento e conservação do ARN transportador no *Manual do Kit QIAamp DSP Virus* ou no *Manual do Kit EZ1 DSP Virus*.

**Importante:** O *controlo interno* do kit *artus* CMV LC PCR pode ser utilizado diretamente no procedimento de isolamento. Assegurar de que é incluída uma amostra negativa de plasma no procedimento de isolamento. O sinal correspondente do *controlo interno* funciona como base para a avaliação do isolamento (ver 8.3).

### 8.3 Controlo interno

É fornecido um *controlo interno* (CMV LC IC). Isto permite ao utilizador **controlar o procedimento de isolamento de ADN e verificar a possível inibição da PCR** (ver a Fig. 1). 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 Virus, o ADN é eluído em 60 µl de tampão AVE. Daí que, devem ser adicionados 6 µl de *controlo interno*. Durante a utilização do kit EZ1 DSP Virus, o *controlo interno* tem de ser adicionado seguindo as instruções constantes no *Manual do Kit EZ1 DSP Virus*. A quantidade de *controlo interno* acrescentada depende **apenas** do volume de eluição. O *controlo interno* e o ARN transportador (ver **8.2 Isolamento de ADN**) devem ser adicionados seguindo estritamente as instruções constantes do *Manual do Kit QIAamp DSP Virus* ou do *Manual do Kit EZ1 DSP Virus*.

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

refrigerado pode, em poucas horas, desativar o *controle interno* e diminuir a eficiência da extração). **Não** adicionar o *controle interno* e o ARN transportador diretamente na amostra.

Para a purificação ser considerada eficaz, o valor Ct do *controle interno* de uma amostra negativa de plasma processada por purificação tem de atingir o valor Ct indicado na tabela 1. 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 nossa assistência técnica.

Tabela 1: Faixa de valores Ct aceites do *controle interno* de uma amostra negativa de plasma.

Kit purificação	de Instrumento	Canal de fluorescência	Método de análise	Valor Ct
Kit QIAamp DSP Vírus	<i>LightCycler</i> 1.1/1.2/1.5	F3/Back-F1	<i>Segundo máximo derivativo</i>	14 ± 3
Kit QIAamp DSP Vírus	<i>LightCycler</i> 2.0	705/Back 530	<i>Auto</i>	14 ± 3
Kit EZ1 DSP Vírus	<i>LightCycler</i> 1.1/1.2/1.5	F3/Back-F1	<i>Segundo máximo derivativo</i>	15 ± 3
Kit EZ1 DSP Vírus	<i>LightCycler</i> 2.0	705/Back 530	<i>Auto</i>	15 ± 3

O *controle interno* pode ser utilizado, opcionalmente, **exclusivamente para o controle de uma possível inibição da PCR** (ver a Fig. 2). Para isso, adicionar 1 µl de *controle interno* e 2,5 µl de *CMV Mg-Sol* por reação diretamente a 12,5 µl de *CMV LC Master*. Para cada reação de PCR, utilizar 15 µl de Master Mix desta forma produzida\* e adicionar, de seguida, 10 µl de amostra purificada. Em caso de preparação de um ensaio de PCR para várias amostras, aumentar o volume de *CMV LC Master*, *CMV Mg-Sol* e de *controle interno* proporcionalmente ao número de amostras (ver **8.5 Preparação da PCR**).

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

Os kits *artus* EBV LC PCR e os kits *artus* CMV LC PCR contêm um *controle interno* (IC) idêntico. Os kits HSV-1/2 LC PCR e os kits *artus* VZV LC PCR contêm um *controle interno* idêntico.

## 8.4 Quantificação

Os *padrões de quantificação* fornecidos (CMV QS 1 – 4) são tratados como amostras previamente purificadas e utilizados no mesmo volume (10 µl). Para gerar uma curva padrão no instrumento *LightCycler*, os quatro *padrões de quantificação* devem ser utilizados como se segue:

### Instrumento *LightCycler* 1.1/1.2/1.5

Definir o CMV QS 1 – 4 no ecrã *Sample Loading* (Carregamento da amostra) como padrões com as concentrações especificadas (ver o *Manual do Operador do LightCycler*, versão 3.5, capítulo B, 2.4. *Sample Data Entry* [Introdução de dados das amostras]).

### Instrumento *LightCycler* 2.0

Para definir os padrões, ativar a função *Analysis Type* (Tipo de análise) no menu da janela *Samples* (Amostras) e selecionar *Absolute Quantification* (Quantificação absoluta). É possível agora definir o CMV QS 1 – 4 como padrão e introduzir as concentrações correspondentes para cada padrão (ver o *Manual do Operador do LightCycler*, versão 4.0, capítulo 2.2 *Introdução de informações da amostra*). Assegurar que a função *Enable Controls* (Ativar controlos) **não** está ativada. Caso contrário, a seleção de opções de análise para a análise de dados é limitada (ver **9.2 Análise de dados dos dados PCR no instrumento *LightCycler* 2.0**).

**Caso tenha sido integrado mais do que um sistema *artus* herpes no ensaio de PCR, analisar estes diferentes sistemas com os *padrões de quantificação* correspondentes separadamente.**

**Atenção:** De modo a assegurar uma quantificação precisa, é veementemente recomendado complementar a Master Mix utilizada para os *padrões de quantificação* com a respetiva quantidade de *controle interno*. Para isso,

adicionar para cada *padrão de quantificação* (CMV QS 1 – CMV QS 4) 1 µl de *controlo interno* e 2,5 µl de *CMV Mg-Sol* diretamente a 12,5 µl de *CMV LC Master* (ver esquema reproduzido na Fig. 2). Este esquema de pipetagem é normalmente aplicável aos *padrões de quantificação* do CMV, sendo independente do número de *padrões de quantificação* utilizados.

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

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

Ter em atenção que, 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).

**Importante:** As diretrizes para a análise quantitativa dos sistemas *artus* no instrumento *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ou *LightCycler 2.0* são fornecidas em [www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX](http://www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX) (**Technical Note for quantitation on the *LightCycler 1.1/1.2/1.5* or *LightCycler 2.0* Instrument** - Nota técnica para quantificação nos instrumentos *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ou *LightCycler 2.0*).

## 8.5 Preparação da PCR

Assegurar que o bloco de refrigeração, assim como os adaptadores capilares (acessórios do instrumento *LightCycler*) são previamente arrefecidos até +4 °C. Colocar o número pretendido de capilares *LightCycler* nos adaptadores do bloco de refrigeração. 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 todos os *padrões de quantificação* fornecidos (CMV QS 1 – 4) para cada ensaio de PCR. 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.

Se se pretender utilizar o *controlo interno* para controlar o procedimento de isolamento de ADN e verificar uma possível inibição de PCR, já deverá ter sido adicionado ao isolamento (ver **8.3 Controlo interno**). Neste caso, utilizar o seguinte esquema de pipetagem (ver esquema reproduzido na Fig. 1):

	Número de amostras	1	12
<b>1. Preparação da Master Mix</b>	<i>CMV LC Master</i>	12,5 µl	150 µl
	<i>CMV Mg-Sol</i>	2,5 µl	30 µl
	<i>CMV LC IC</i>	0 µl	0 µl
	<b>Volume total</b>	<b>15 µl</b>	<b>180 µl</b>
<b>2. Preparação do ensaio por PCR</b>	Master Mix	15 µl	15 µl cada
	Amostra	10 µl	10 µl cada
	<b>Volume total</b>	<b>25 µl</b>	<b>25 µl cada</b>

Se se pretender utilizar o *controlo interno exclusivamente para o controlo de uma inibição da PCR*, adicioná-lo diretamente ao *CMV LC Master*. Neste caso, utilizar o seguinte esquema de pipetagem (ver esquema reproduzido na Fig. 2):

	Número de amostras	1	12
<b>1. Preparação da Master Mix</b>	<i>CMV LC Master</i>	12,5 µl	150 µl
	<i>CMV Mg-Sol</i>	2,5 µl	30 µl
	<i>CMV LC IC</i>	1 µl	12 µl
	<b>Volume total</b>	<b>16 µl*</b>	<b>192 µl</b>
<b>2. Preparação do ensaio por PCR</b>	Master Mix	15 µl	15 µl cada
	Amostra/ <i>CMV QS 1 – 4</i>	10 µl	10 µl cada
	<b>Volume total</b>	<b>25 µl</b>	<b>25 µl cada</b>

Pipetar 15 µl de Master Mix (mistura principal) para o reservatório plástico de cada capilar. De seguida, adicionar 10 µl de ADN da amostra eluída. Da mesma forma, deverão ser utilizados 10 µl de, pelo menos, um dos *padrões de quantificação (CMV QS 1 – 4)* como controlo positivo e 10 µl de água (*água, grau de PCR*) como controlo negativo. Fechar os capilares. De modo a criar a curva padrão, é veementemente recomendado complementar a Master Mix utilizada para os *padrões de quantificação* com a respetiva quantidade de *controlo interno* (ver **8.4 Quantificação**). Para transferir a mistura do

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

reservatório plástico para o capilar, centrifugar os adaptadores que contêm os capilares numa centrífuga de mesa durante dez segundos a um máximo de 400 x g (2000 rpm).

### Adição do *controle interno* para a purificação

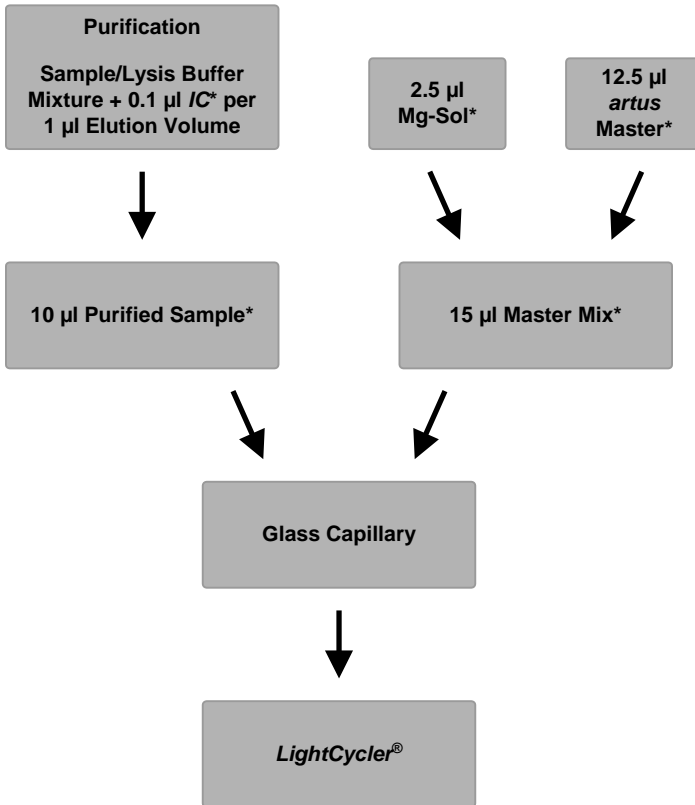


Fig. 1: Fluxo esquemático da operação para o controle da purificação e da inibição da PCR.

\*Certificar-se de que as soluções estão totalmente descongeladas, bem misturadas e brevemente centrifugadas.

### Adição do *controle interno* no *artus* Master

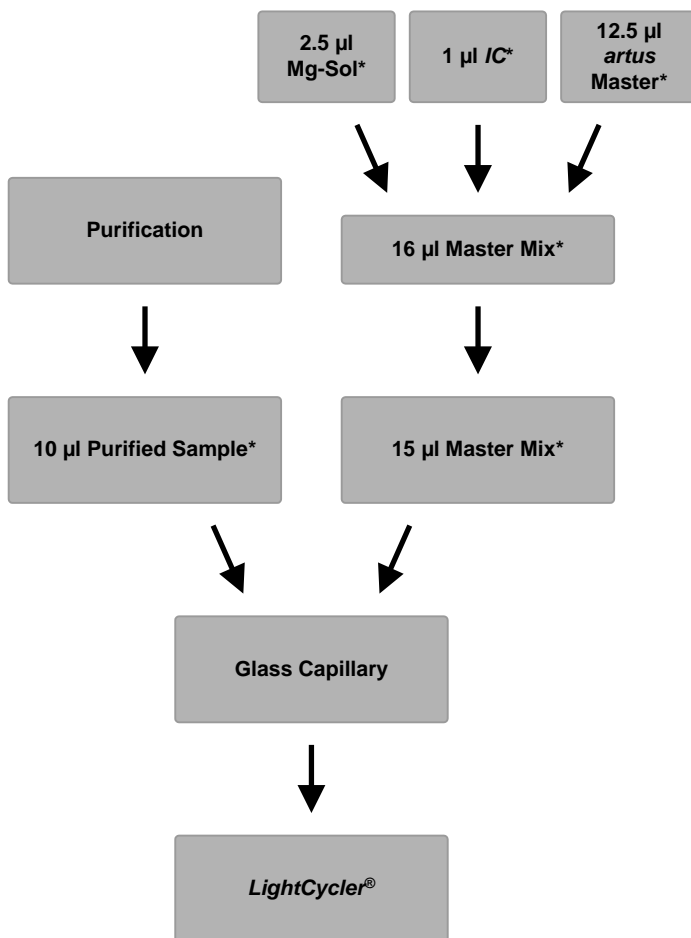


Fig. 2: Fluxo esquemático da operação para o controle da inibição da PCR.

\*Certificar-se de que as soluções estão totalmente descongeladas, bem misturadas e brevemente centrifugadas.

## 8.6 Programação dos instrumentos *LightCycler*

### 8.6.1 Programação do instrumento *LightCycler 1.1/1.2/1.5*

Para a detecção de ADN do CMV, criar um perfil de temperatura no instrumento *LightCycler 1.1/1.2/1.5* de acordo com os cinco passos seguintes (ver Fig. 3 – 7).

- |    |   |        |
|----|---|--------|
| A. | Ativação inicial da enzima de começo quente | Fig. 3 |
| B. | Passo de descida                            | Fig. 4 |
| C. | Amplificação do ADN                         | Fig. 5 |
| D. | Curva de fusão ( <b>opcional</b> )          | Fig. 6 |
| E. | Refrigeração                                | Fig. 7 |

Prestar especial atenção às definições de *modo de análise*, *dados dos programas de ciclo* e *temperaturas-alvo*. Estas definições estão enquadradas a negrito, nas ilustrações que se seguem. É possível encontrar mais informações sobre a programação do instrumento *LightCycler 1.1/1.2/1.5* no *Manual do Operador do LightCycler*. O passo D (curva de fusão) no programa PCR é **opcional** e é apenas necessário para a diferenciação de HSV1 e HSV2 durante a utilização do kit *artus HSV-1/2 LC PCR*.

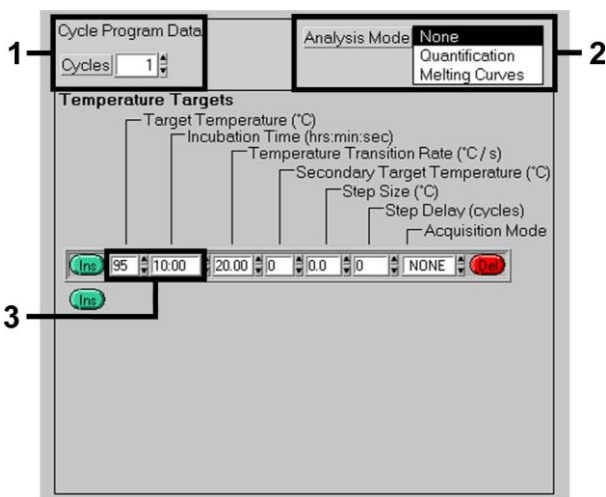


Fig. 3: Ativação inicial da enzima de começo quente.

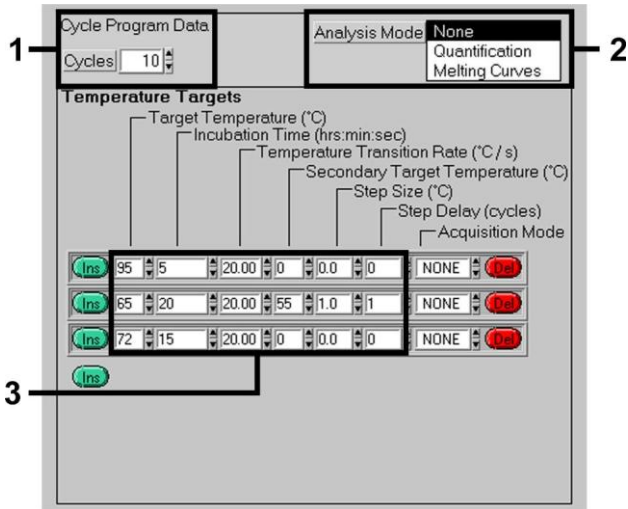


Fig. 4: Passo de descida.

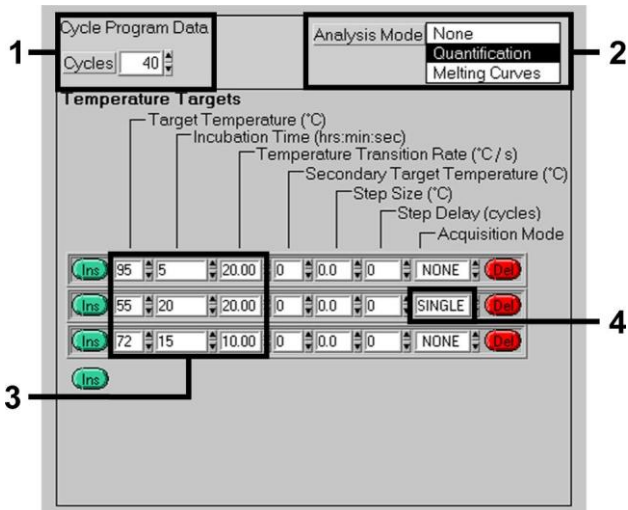


Fig. 5: Amplificação do ADN.

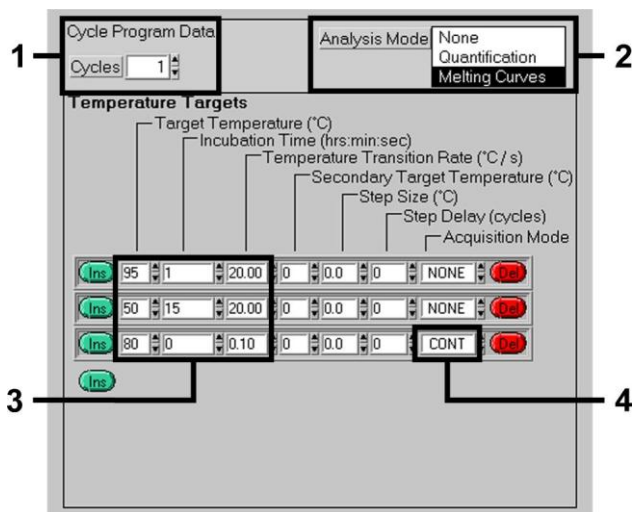


Fig. 6: Curva de fusão (apenas aplicável, se o kit *artus* HSV-1/2 LC PCR for utilizado em paralelo).

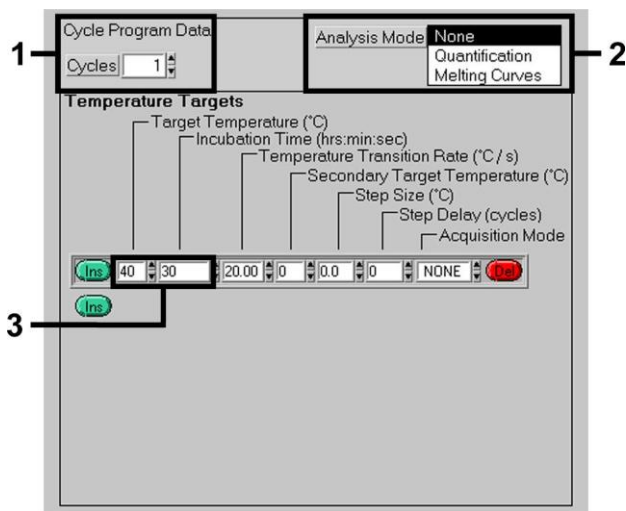


Fig. 7: Refrigeração.



## 8.6.2 Programação do instrumento *LightCycler 2.0*

Para programar um ensaio de PCR com o instrumento *LightCycler 2.0*, ativar a opção *New* (Novo) no menu principal e selecionar *LightCycler Experiment* (Experiência LightCycler).

De seguida, para a detecção de ADN do CMV, criar um perfil de temperatura no instrumento *LightCycler 2.0* de acordo com os cinco passos seguintes (ver Fig. 8 – 12).

- A. Ativação inicial da enzima de começo quente Fig. 8
- B. Passo de descida Fig. 9
- C. Amplificação do ADN Fig. 10
- D. Curva de fusão (**opcional**) Fig. 11
- E. Refrigeração Fig. 12

O passo D no programa PCR é **opcional** e é apenas necessário para a diferenciação de HSV1 e HSV2 durante a utilização do kit *artus* HSV-1/2 LC PCR.

Assegurar que primeiro é introduzido o número de capilares preparados para este ensaio de PCR (*Max. Seek Pos.*, ver Fig. 8).

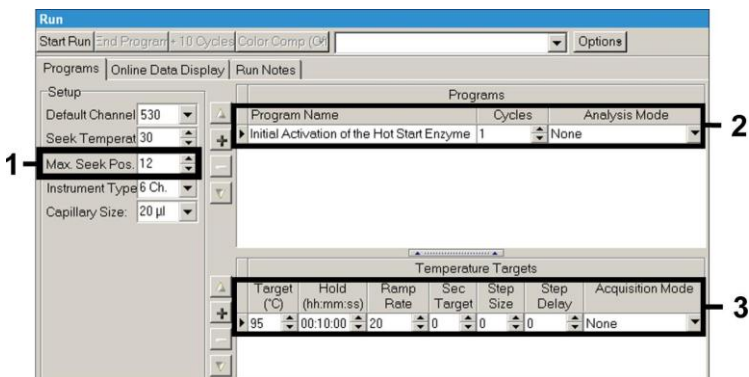


Fig. 8: Ativação inicial da enzima de começo quente.

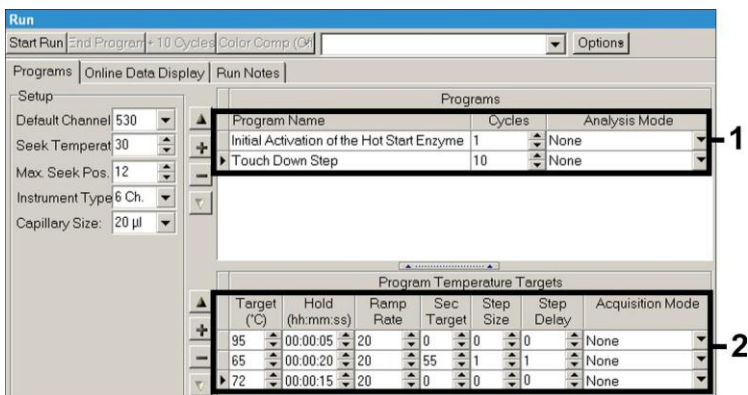


Fig. 9: Passo de descida.

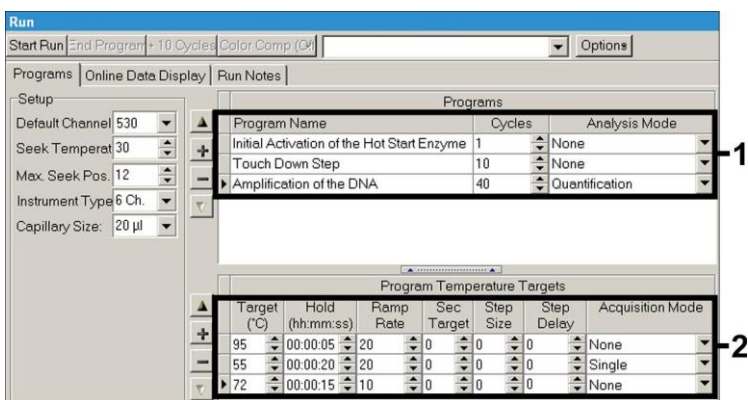


Fig. 10: Amplificação do ADN.

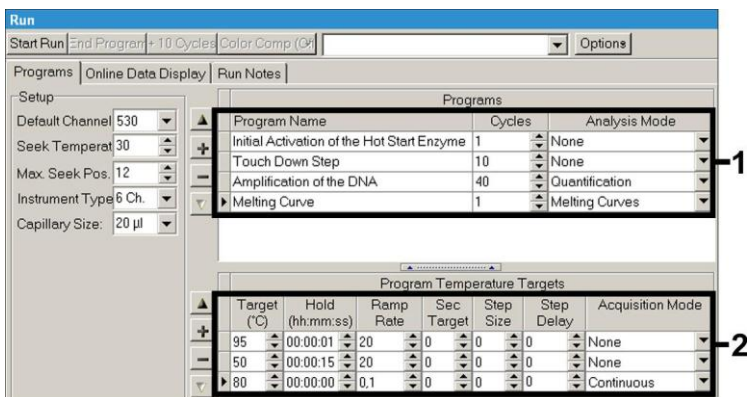


Fig. 11: Curva de fusão (apenas aplicável, se o kit *artus HSV-1/2 LC PCR* for utilizado em paralelo).

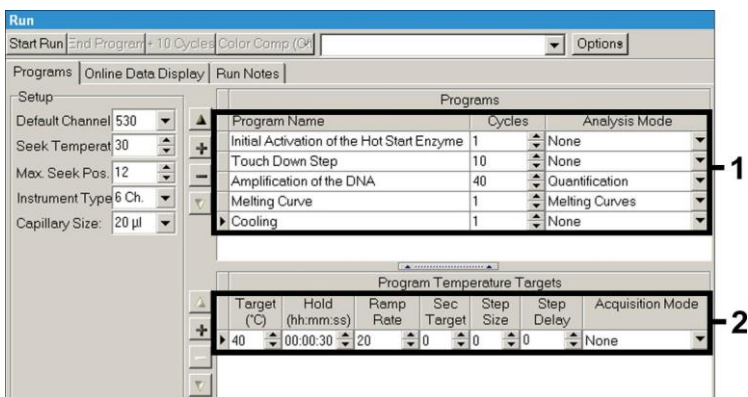


Fig. 12: Refrigeração.

Para introduzir especificações de amostras, ativar o botão *Samples* (Amostras).

- Na janela *Capillary View* (Vista capilar) começar por introduzir o número total de preparações de PCR planeadas para o ensaio de PCR (*Sample Count* [Contagem de amostras]).

- De seguida, atribuir nomes às amostras em *Sample Name* (Nome da amostra).
- Em *Selected Channels* (Canais selecionados), selecionar também os canais de fluorescência 530 para a deteção da PCR analítica do CMV e 705 para a deteção da PCR do *controlo interno*.
- Para definir os padrões e para atribuir as concentrações correspondentes, selecionar a opção *Absolute Quantification* em *Analysis Type* (ver **8.4 Quantificação**).
- Assegurar que a função *Enable Controls* **não** está ativada. Caso contrário, a seleção de opções de análise para a análise de dados é limitada (o modo *Fit Points* [Pontos de ajuste] não está disponível, ver **9.2 Análise de dados dos dados PCR no instrumento LightCycler 2.0**). Em *Target Name* (Nome do alvo), é possível atribuir as sequências alvo a serem detetadas (CMV ou *controlo interno*) nos canais de fluorescência 530 e 705 selecionados. O preenchimento da coluna *Target Name* pode ser facilitada com a função *Auto Copy* (Copiar automaticamente). Definir o *Target Name* ajuda a obter uma melhor perspetiva geral, mas não é estritamente necessário para a análise de dados.
- Para gerar uma curva padrão para análise de dados, os *padrões de quantificação* devem ser definidos com as concentrações correspondentes. Por conseguinte, selecionar *Standard* em *Sample Type* e introduzir a concentração correspondente para cada padrão em *Concentration*.
- O perfil de temperatura programado pode ser armazenado no disco rígido do computador, a fim de ser utilizado novamente para outros ensaios. Para isso, ativar a função *Save As* (Guardar como) no menu *File* (Ficheiro), o que fará surgir uma nova janela. Em *Templates and Macros* (Modelos e macros), selecionar o submenu *Run Templates* (Executar modelos) e guardar os dados com um nome adequado.
- Para iniciar o ensaio de PCR, mudar para o campo *Run* (Ensaio) e ativar a função *Start Run* (Iniciar ensaio) (ver Fig. 13). O programa PCR irá

iniciar depois de se introduzir a localização onde os dados deverão ser guardados.

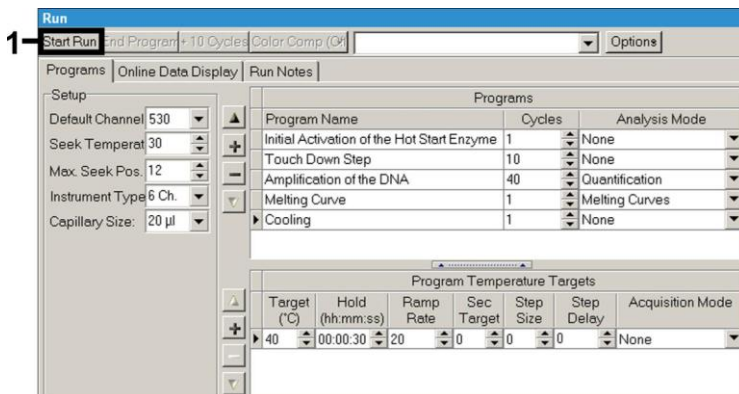


Fig. 13: Início do ensaio de PCR.

## 9. Análise de dados

### 9.1 Análise de dados dos dados de PCR no instrumento *LightCycler 1.1/1.2/1.5*

Para análise dos dados de PCR colhidos com o instrumento *LightCycler 1.1/1.2/1.5*, recomendamos a utilização do software *LightCycler* versão 3.5.

Em análises multicoloridas registam-se interferências entre canais de fluorescência. O software do instrumento *LightCycler 1.1/1.2/1.5* contém um ficheiro denominado *Color Compensation File*, que compensa estas interferências. Abrir este ficheiro antes, durante ou após o ensaio de PCR, ativando o botão *Choose CCC File* ou *Select CC Data*. Caso não tenha sido instalado qualquer ficheiro *Color Compensation File*, gerar o ficheiro seguindo as instruções fornecidas no *Manual do Operador do LightCycler*. Depois de ativado o ficheiro *Color Compensation File*, surgem sinais separados nos canais de fluorescência F1, F2 e F3. Para a análise dos resultados de PCR obtidos com o kit *artus CMV LC PCR*, selecionar as opções de visualização

de fluorescência F1 para a PCR analítica do CMV e F3/Back-F1 para a PCR do *controle interno*, respetivamente. Para a análise dos ensaios quantitativos, seguir as instruções fornecidas em **8.4 Quantificação** e em **Technical Note for quantitation on the LightCycler 1.1/1.2/1.5 or LightCycler 2.0 Instrument** (Nota técnica para quantificação nos instrumentos LightCycler 1.1/1.2/1.5 ou LightCycler 2.0) em [www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX](http://www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX).

**Caso tenha sido integrado mais do que um sistema artus herpes no ensaio de PCR, analisar estes diferentes sistemas com os padrões de quantificação correspondentes separadamente. Selecionar as posições no carrossel para a análise de acordo com o necessário.**

Os seguintes resultados podem ser obtidos:

1. É detetado um sinal no canal de fluorescência F1.

**O resultado da análise é positivo: A amostra contém ADN do CMV.**

Neste caso, é dispensável a deteção de um sinal no canal F3/Back-F1, uma vez que concentrações iniciais elevadas de ADN do CMV (sinal positivo no canal -F1) podem originar um sinal de fluorescência reduzido ou ausente do *controle interno* no canal F3/Back-F1 (concorrência).

2. Não é detetado sinal no canal de fluorescência F1. Ao mesmo tempo, aparece um sinal do *controle interno* no canal F3/Back-F1.

**Não é detetável ADN de CMV na amostra. Pode ser considerada negativa.**

No caso de uma PCR negativa para CMV, o sinal detetado do *controle interno* exclui a possibilidade de inibição da PCR.

3. Não é detetado sinal nos canais F1 ou F3/Back-F1.

**Não é possível fazer uma avaliação diagnóstica.**

É possível encontrar informações sobre fontes de erros e respetivas soluções em **10. Resolução** de problemas.

São fornecidos exemplos de reações de PCR positivas e negativas na Fig. 14 e Fig. 15.

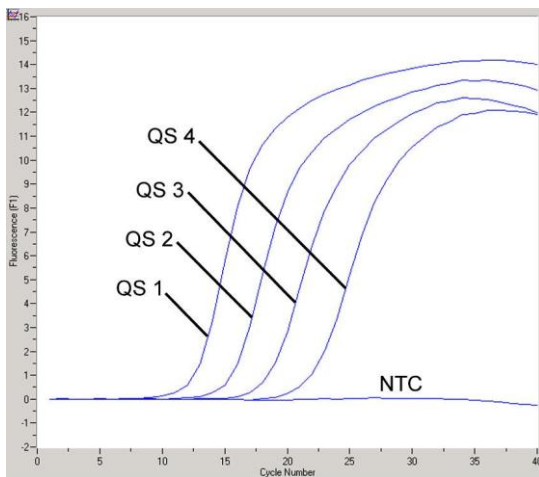


Fig. 14: Detecção dos *padrões de quantificação* (CMV QS 1 – 4) no canal de fluorescência F1 do instrumento *LightCycler 1.1/1.2/1.5*. NTC: controle sem modelo (controle negativo).

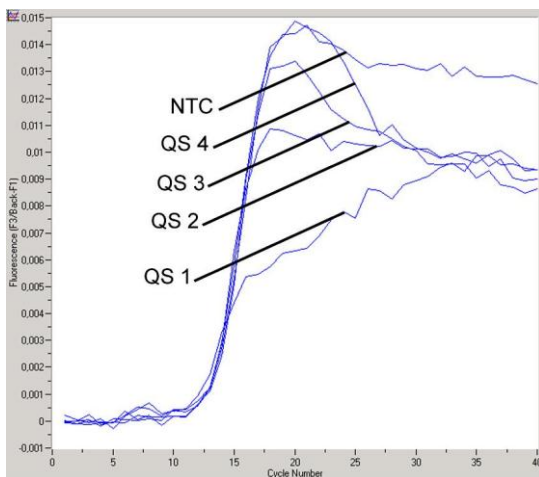


Fig. 15: Detecção do *controle interno* (IC) no canal de fluorescência F3/Back-F1 do instrumento *LightCycler 1.1/1.2/1.5* com amplificação simultânea dos *padrões de quantificação* (CMV QS 1 – 4). NTC: controle sem modelo (controle negativo).

## 9.2 Análise de dados dos dados de PCR no instrumento *LightCycler 2.0*

Para análise dos dados de PCR colhidos com o instrumento *LightCycler 2.0*, utilizar o software *LightCycler* versão 4.0. Considerar as instruções facultadas no *Manual do Operador do Instrumento LightCycler 2.0 Versão 4.0*.

Para a análise de dados de PCR, proceder da seguinte forma (ver a Fig. 16):

- Ativar a função *Analysis* (Análise) na faixa de menus e selecionar a opção *Absolute Quantification*. Como regra geral, todos os dados de amplificação gerados com o kit *artus LC PCR* devem ser analisados com esta função.
- O software do instrumento *LightCycler* versão 4.0 contém um ficheiro denominado *Color Compensation File*, que compensa estas interferências de análises multicores entre canais de fluorescência. Abrir este ficheiro durante ou após o ensaio de PCR ativando o botão *Color Comp (On/Off)* (Compensação de cor [ligado/desligado] e, de seguida, o botão *Select Color Compensation* (Selecionar compensação de cor) (ver a Fig. 16). Caso não tenha sido instalado qualquer ficheiro *Color Compensation File*, gerar o ficheiro seguindo as instruções fornecidas no *Manual do Operador do LightCycler*.
- Depois de ativado o ficheiro *Color Compensation File*, surgem sinais separados nos canais de fluorescência. Para a análise dos resultados de PCR obtidos com o kit *artus CMV LC PCR*, selecionar as opções de visualização de fluorescência 530 para a PCR analítica do CMV e 705/Back 530 para a PCR do *controlo interno*, respetivamente.



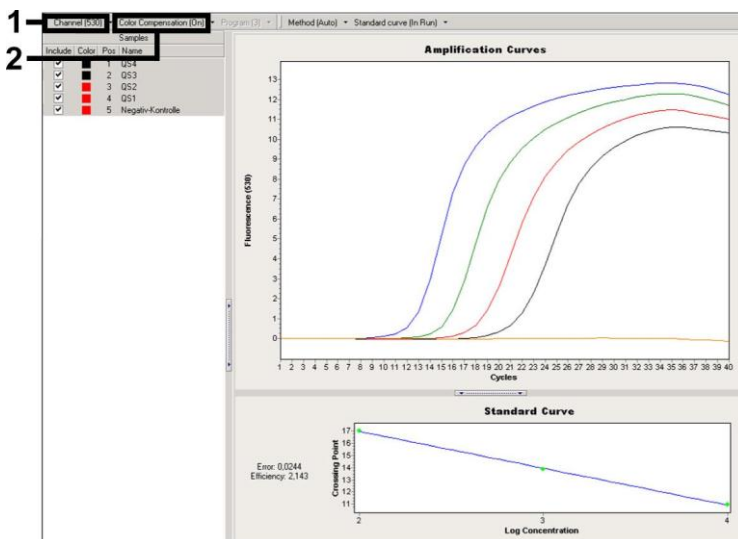


Fig. 16: Ativação do ficheiro *Color Compensation File* e seleção do canal de fluorescência.

Para a análise dos ensaios quantitativos, seguir as instruções fornecidas em **8.4 Quantificação** e em **Technical Note for quantitation on the LightCycler 1.1/1.2/1.5 or LightCycler 2.0 Instrument** (Nota técnica para quantificação nos instrumentos LightCycler 1.1/1.2/1.5 ou LightCycler 2.0) em [www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX](http://www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX).

Assim que a configuração das opções de análise esteja concluída, são possíveis os seguintes resultados:

1. É detetado um sinal no canal de fluorescência 530.

**O resultado da análise é positivo: A amostra contém ADN do CMV.**

Neste caso, é dispensável a deteção de um sinal no canal 705/Back 530, uma vez que concentrações iniciais elevadas de ADN do CMV (sinal positivo no canal -530) podem originar um sinal de fluorescência reduzido ou ausente do *controlo interno* no canal 705/Back 530 (concorrência).

2. Não é detetado sinal no canal de fluorescência 530. Ao mesmo tempo, aparece um sinal do *controle interno* no canal 705/Back 530.

**Não é detetável ADN de CMV na amostra. Pode ser considerada negativa.**

No caso de uma PCR negativa para CMV, o sinal detetado do *controle interno* exclui a possibilidade de inibição da PCR.

3. Não é detetado sinal nos canais 530 ou 705/Back 530.

**Não é possível fazer uma avaliação diagnóstica.**

É possível encontrar informações sobre fontes de erros e respetivas soluções em **10. Resolução** de problemas.

São fornecidos exemplos de reações de PCR positivas e negativas na Fig. 17 e Fig. 18.

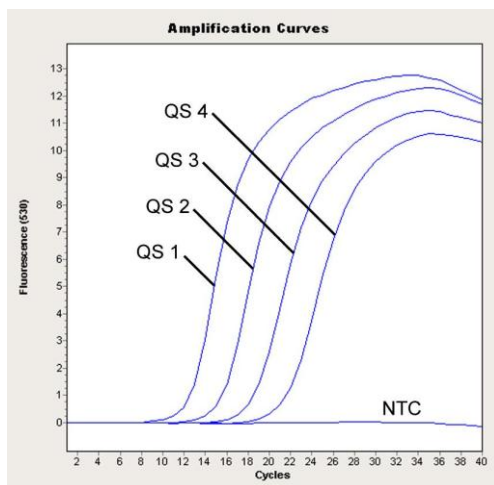


Fig. 17: Detecção dos *padrões de quantificação* (CMV QS 1 – 4) no canal de fluorescência 530 do instrumento *LightCycler 2.0*. NTC: controle sem modelo (controle negativo).

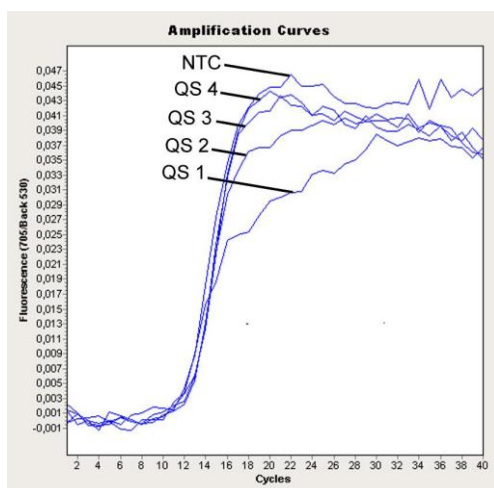


Fig. 18: Detecção do *controle interno* (IC) no canal de fluorescência 705/Back 530 do instrumento *LightCycler 2.0* com amplificação simultânea dos *padrões de quantificação*

(*CMV QS 1 – 4*). NTC: controlo sem modelo (controlo negativo).

## 10. Resolução de problemas

### Ausência de sinal nos controlos positivos (*CMV QS 1 – 4*) no canal de fluorescência F1 ou 530:

- O canal de fluorescência selecionado para análise dos dados de PCR não cumpre o protocolo.
  - Para análise de dados, selecionar o canal de fluorescência F1 ou 530 para a PCR analítica do CMV e o canal de fluorescência F3/Back-F1 ou 705/Back 530 para a PCR do *controlo interno*.
- Programação incorreta do perfil de temperatura do instrumento *LightCycler 1.1/1.2/1.5* ou *LightCycler 2.0*.
  - Comparar o perfil de temperatura com o protocolo (ver **8.6 Programação do instrumento *LightCycler***).
- Configuração incorreta da reação de PCR.
  - Rever os passos com ajuda do esquema de pipetagem (ver **8.5 Preparação da PCR**) e, se for o caso, repetir a PCR.
- As condições de conservação para um ou mais componentes do kit não cumprem as instruções fornecidas em **2.Prazo de validade de Conservação** ou do kit *artus CMV LC PCR* expirou.
  - Verificar as condições de conservação e a data de validade (ver etiqueta do kit) dos reagentes e usar um novo kit, caso seja necessário.

### Sinal fraco ou inexistente do *controlo interno* de uma amostra de plasma negativa processada por purificação (desvio superior a $Ct = 14 \pm 3$ durante a utilização do kit *QIAamp DSP Virus*; desvio superior a $Ct = 15 \pm 3$ durante a utilização do kit *EZ1 DSP Virus*; ver a tabela 1) e ausência simultânea de um sinal no canal F1 ou 530:

- As condições de 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.

- A PCR foi inibida.
  - Assegurar que é utilizado o procedimento de isolamento recomendado (ver **8.2 Isolamento de ADN**) e cumprir estritamente as instruções do fabricante.
  - Certificar-se de que é efetuado o passo recomendado de centrifugação adicional para completa eliminação de resíduos de etanol antes da eluição no isolamento de ADN (ver **8.2 Isolamento de ADN**).
- Ocorreram perdas de ADN durante a extração.
  - Se o *controlo interno* tiver sido adicionado à extração, a ausência de um sinal do *controlo interno* pode indicar a perda de ADN durante a extração. Certificar-se de que é utilizado um procedimento de isolamento recomendado (ver **8.2 Isolamento de ADN**) e cumprir estritamente as instruções do fabricante.
- As condições de conservação para um ou mais componentes do kit não cumprem as instruções fornecidas em **2.Prazo de validade de Conservação** ou do kit *artus CMV LC PCR* expirou.
  - Verificar as condições de conservação 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 F1 ou 530 da PCR analítica.**

- Ocorreu uma contaminação 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.
  - Pipetar o controlo positivo sempre no fim.
  - Assegurar que o espaço de trabalho e os instrumentos são descontaminados regularmente.
- Ocorreu uma contaminação 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.

Em caso de dúvidas ou problemas, contactar a nossa assistência técnica.

## 11. Especificações

### 11.1 Sensibilidade analítica

Para o kit *artus* CMV LC PCR, foi determinado tanto o limite de detecção analítica quanto o limite de detecção analítica relativa à purificação (limites de sensibilidade). O limite de detecção analítica relativa à purificação é determinado através de amostras clínicas positivas para o CMV e de acordo com o método de extração utilizado. O limite de detecção analítica, por sua vez, é determinado sem amostras clínicas e independente do método de extração selecionado através de ADN de CMV com uma determinada concentração.

Para determinar a **sensibilidade analítica** do kit *artus* CMV LC PCR, foi criada uma série de diluições de ADN genómico de CMV de 10 ao valor nominal de 0,00316 cópias/μl de CMV e analisadas no **instrumento *LightCycler 1.1/1.2/1.5*** em conjunto com o kit *artus* CMV LC PCR. As análises foram efetuadas em três dias diferentes em oito replicações. Os resultados foram apurados com a ajuda de uma análise de probit. O limite de detecção analítica do kit *artus* CMV LC PCR em conjunto com o instrumento *LightCycler 1.1/1.2/1.5* é de 0,49 cópias/μl ( $p = 0,05$ ). Isto significa que existe uma probabilidade de 95% de o limite de 0,49 cópias/μl ser detetado.

A **sensibilidade analítica relativa à purificação (kit QIAamp DSP Virus)** do kit *artus* CMV LC PCR no **instrumento *LightCycler 1.1/1.2/1.5*** foi determinada com uma série de diluições de material do CMV de 1000 ao valor nominal de 0,316 cópias/ml de CMV 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: 60 μl). Cada uma das oito diluições foi analisada com kit *artus* CMV LC PCR em três dias diferentes em

oito replicações. Os resultados foram apurados com a ajuda de uma análise de probit. É apresentada uma ilustração gráfica da análise de probit em Fig. 19. O limite de detecção analítica tendo em conta a purificação do kit *artus* CMV LC PCR em conjunto com o instrumento *LightCycler 1.1/1.2/1.5* é de 64,9 cópias/ $\mu$ l ( $p = 0,05$ ). Isto significa que existe uma probabilidade de 95% de o limite de 64,9 cópias/ml ser detetado.

#### **Análise de probit: Citomegalovírus (*LightCycler 1.1/1.2/1.5*)**

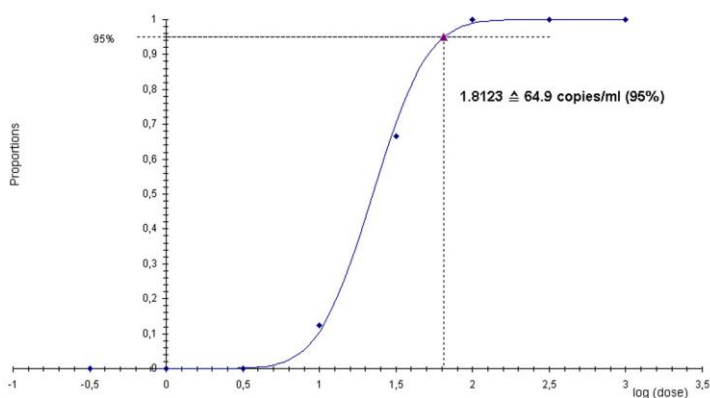


Fig. 19: Sensibilidade analítica relativa à purificação (kit QIAamp DSP Virus) do kit *artus* CMV LC PCR no instrumento *LightCycler 1.1/1.2/1.5*.

Para determinar a **sensibilidade analítica** do kit *artus* CMV LC PCR, foi criada uma série de diluições de ADN genómico de CMV de 10 ao valor nominal de 0,00316 cópias/ $\mu$ l de CMV e analisadas no **instrumento *LightCycler 2.0*** em conjunto com o kit *artus* CMV LC PCR. As análises foram efetuadas em três dias diferentes em oito replicações. Os resultados foram apurados com a ajuda de uma análise de probit. O limite de detecção analítica do kit *artus* CMV LC PCR em conjunto com o instrumento *LightCycler 2.0* é de 0,65 cópias/ $\mu$ l ( $p = 0,05$ ). Isto significa que existe uma probabilidade de 95% de o limite de 0,65 cópias/ $\mu$ l ser detetado.

A **sensibilidade analítica relativa à purificação (kit QIAamp DSP Virus)** do kit *artus* CMV LC PCR no instrumento **LightCycler 2.0** foi determinada com uma série de diluições de material do CMV de 1000 ao valor nominal de 0,316 cópias/ml de CMV 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: 60 µl). Cada uma das oito diluições foi analisada com kit *artus* CMV LC PCR em três dias diferentes em oito replicações. Os resultados foram apurados com a ajuda de uma análise de probit. É apresentada uma ilustração gráfica da análise de probit em Fig. 20. O limite de deteção analítica tendo em conta a purificação do kit *artus* CMV LC PCR em conjunto com o instrumento *LightCycler 2.0* é de 78,9 cópias/µl ( $p = 0,05$ ). Isto significa que existe uma probabilidade de 95% de o limite de 78,9 cópias/ml ser detetado.

#### **Análise de probit: Citomegalovírus (LightCycler 2.0)**

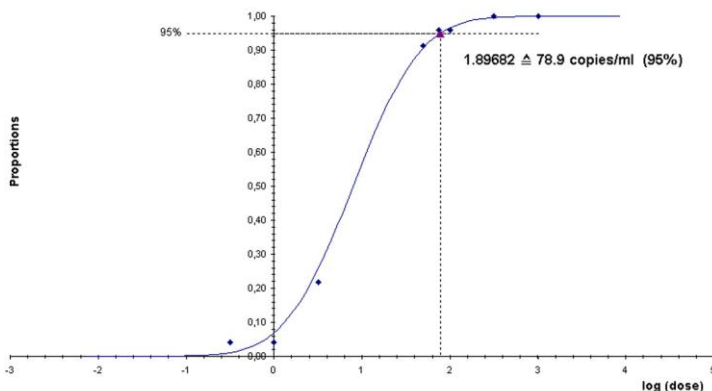


Fig. 20: Sensibilidade analítica relativa à purificação (kit QIAamp DSP Virus) do kit *artus* CMV LC PCR no instrumento *LightCycler 2.0*.

O limite de deteção analítica tendo em conta a purificação do kit *artus* CMV LC PCR em conjunto com o instrumento *LightCycler*



1.1/1.2/1.5/2.0 e o kit EZ1 DSP Virus (volume de extração: 0,4 ml, volume de eluição: 60 µl) no EZ1 Advanced ou BioRobot EZ1 DSP é de 67,2 cópias/ml ( $p = 0,05$ ). Isto significa que existe uma probabilidade de 95 % de o limite de 67,2 cópias/ml ser detetado.

## 11.2 Especificidade

A especificidade do kit *artus* CMV LC 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 as estripes relevantes foi assim assegurada.

Além disso, a especificidade foi validada com 100 amostras diferentes de plasma negativo para CMV. Estas não geraram quaisquer sinais com os primers e sondas específicos do CMV que estão incluídos no *CMV LC Master*.

Para determinar a especificidade do kit *artus* CMV LC PCR, foi testado o grupo de controlo indicado na tabela que se segue (ver Tabela 2) quanto a reações cruzadas. Nenhum dos agentes patogénicos testados era reativo. Em infeções mistas, não ocorrem reações cruzadas.

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

Grupo de controlo	CMV (F1)	Controlo interno (F3/Back-F1)
Vírus herpes humano 1 (vírus Herpes simplex 1)	-	+
Vírus herpes humano 2 (vírus Herpes simplex 2)	-	+
Vírus do herpes humano 3 (vírus Varicela-zóster)	-	+
Vírus do herpes humano 4 (vírus Epstein-Barr)	-	+
Vírus do herpes humano 6A	-	+
Vírus do herpes humano 6B	-	+
Vírus do herpes humano 7	-	+
Vírus do herpes humano 8 (vírus do herpes associado ao sarcoma de Kaposi)	-	+
Vírus da Hepatite A	-	+
Vírus da hepatite B	-	+
Vírus da Hepatite C	-	+
Vírus da Imunodeficiência Humana 1	-	+
Vírus da leucemia de células T humano tipo 1	-	+
Vírus da leucemia de células T humano tipo 2	-	+
Vírus da Febre do Vale do Nilo	-	+
Enterovírus	-	+
Parvovírus B19	-	+

### 11.3 Precisão

Os dados de precisão do kit *artus* CMV LC PCR foram recolhidos através do instrumento *LightCycler 1.1/1.2/1.5* e permitem apurar 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 a **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* CMV LC PCR foram recolhidos utilizando o *padrão de quantificação* com a menor concentração (QS 4; 10 cópias/μl). O teste foi realizado com oito replicações. Os dados de precisão foram calculados com base nos valores de Ct das curvas de amplificação (CT: *ciclo limite*, ver Tabela 3). Além disso, foram determinados dados de precisão para resultados quantitativos em cópias/μl, utilizando os valores de Ct correspondentes (ver Tabela 4). De acordo com estes resultados, o intervalo estatístico de uma amostra qualquer com a concentração indicada é de 2,47% (Ct) ou 14,06% (conc.), para a deteção do *controlo interno* 5,31% (Ct). Estes valores baseiam-se na totalidade de todos os valores individuais das variabilidades apuradas.

Tabela 3: Dados de precisão com base nos valores Ct.

	Desvio-padrão	Variância	Coefficiente de variação [%]
Variabilidade intra-ensaio: <i>CMV QS 4</i>	0,14	0,02	0,68
Variabilidade intra-ensaio: <i>Controlo interno</i>	0,04	0,00	0,32
Variabilidade entre ensaios: <i>CMV QS 4</i>	0,21	0,04	1,00
Variabilidade entre ensaios: <i>Controlo interno</i>	0,14	0,02	1,18
Variabilidade entre lotes: <i>CMV QS 4</i>	0,54	0,30	2,50
Variabilidade entre lotes: <i>Controlo interno</i>	0,72	0,52	5,73
Variância total: <i>CMV QS 4</i>	0,53	0,28	2,47
Variância total: <i>Controlo interno</i>	0,64	0,41	5,31

Tabela 4: Dados de precisão com base nos valores quantitativos (em cópias/μl).

	Desvio-padrão	Variância	Coefficiente de variação [%]
Variabilidade intra-ensaio: CMV QS 4	1,02	1,05	10,18
Variabilidade entre ensaios: CMV QS 4	1,35	1,81	13,35
Variabilidade entre lotes: CMV QS 4	1,64	2,69	16,19
Variância total: CMV QS 4	1,42	2,02	14,06

## 11.4 Robustez

A verificação da robustez permite determinar a taxa total de erro do kit *artus* CMV LC PCR. 100 amostras de plasma negativas foram contaminadas com ADN de CMV numa concentração final de 170 cópias/ml (aproximadamente três vezes a concentração dos limites de sensibilidade analíticos). Após a extração utilizando o kit QIAamp DSP Virus (ver **8.2 Isolamento de ADN**), estas amostras foram analisadas com o kit *artus* CMV LC PCR. A taxa de erro foi de 0% para a totalidade das amostras de CMV. A robustez do *controlo interno* foi verificada adicionalmente através da purificação e da análise de 100 amostras de plasma negativas para o CMV. Deste modo, a robustez do kit *artus* CMV LC PCR é de  $\geq 99\%$ .

## 11.5 Reprodutibilidade

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

## 11.6 Avaliação diagnóstica

O kit *artus* CMV LC PCR foi avaliado num estudo. Ao comparar o kit *artus* CMV LC PCR com o teste COBAS® AMPLICOR® CMV MONITOR®, 177 amostras clínicas de plasma com EDTA foram analisadas retro e prospetivamente. Todas as amostras foram previamente analisadas positivas ou negativas utilizando o COBAS AMPLICOR CMV MONITOR para diagnóstico de rotina.

As amostras para testar o kit *artus* CMV LC PCR foram isoladas através da adição do *controlo interno* do kit *artus* CMV LC PCR utilizando o kit QIAamp DSP Virus e, posteriormente, analisadas com o *Instrumento LightCycler*. As amostras para o teste COBAS AMPLICOR CMV MONITOR foram isoladas e analisadas de acordo com as instruções do fabricante fornecidas no folheto informativo da embalagem.

Todas as 11 amostras que se revelaram positivas com o teste COBAS AMPLICOR CMV MONITOR também se revelaram positivas com o kit *artus* CMV LC PCR. Todas as 144 amostras que se revelaram negativas com o teste COBAS AMPLICOR CMV MONITOR também se revelaram negativas com o kit *artus* CMV LC PCR. Obtiveram-se 22 resultados discordantes. Os resultados encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados do estudo de validação comparativo.

TESTE COBAS AMPLICOR CMV MONITOR				
		+	-	Total
Kit <i>artus</i> CMV LC PCR	+	11	22	33
	-	0	144	144

Se os resultados obtidos com o teste COBAS AMPLICOR CMV MONITOR forem considerados como referência, a sensibilidade de diagnóstico de todas as amostras do kit *artus* CMV LC PCR é de 100%, sendo a especificidade de diagnóstico de 86,7%.

Uma posterior análise das 22 amostras discordantes confirmaram os resultados dos kits *artus* PCR. Assim, pode supor-se que a discrepância se baseia numa maior sensibilidade do kit *artus* CMV LC PCR.

## 12. Limitações da utilização do produto

- 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 detetar a presença do vírus. A validade e o desempenho do ensaio são revistos regularmente.

## 13. Informações de segurança

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 (SDS) adequadas. Estas estão disponíveis online no formato PDF, prático e compacto, no endereço [www.qiagen.com/safety](http://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.

## 14. Controlo de qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade Total da QIAGEN, todos os lotes do kit *artus* CMV LC PCR são testados face a especificações predeterminadas, para garantir uma qualidade consistente do produto.

## **15. Referências**

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.



## 16. Explicação dos símbolos



Prazo de validade



Código de lote



Fabricante



Número de catálogo



Número do material



Manual



Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*



Componentes



Contém



Número



Número do item de comércio mundial



<N>

Contém o suficiente para <N> testes



Limites de temperatura



Consultar as instruções de utilização

**QS**

*Padrão de quantificação*

**IC**

*Controlo interno*

**Mg-Sol**

*Solução de magnésio*

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Kit *artus* CMV LC PCR

Marcas comerciais e renúncia de responsabilidade  
QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, BioRobot®, EASYartus®, EZ1® (QIAGEN Group); *LightCycler*®, AMPLICOR®, COBAS®, MONITOR® (Roche Diagnostics GmbH).

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.

A AQUISIÇÃO DESTE PRODUTO GARANTE AO COMPRADOR DIREITOS AO ABRIGO DE UMA OU MAIS DAS PATENTES NÚMEROS 6,174,670, 7,160,998, 6,569,627 E 6,245,514 NOS ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA E RESPECTIVOS HOMÓLOGOS ESTRANGEIROS PARA UTILIZAÇÃO EXCLUSIVA DESTE PRODUTO EM SERVIÇOS DE DIAGNÓSTICO IN VITRO EM HUMANOS E ANIMAIS. NÃO É AQUI CONCEDIDA PATENTE GERAL OU OUTRA LICENÇA DE QUALQUER TIPO ALÉM DESTE DIREITO DE UTILIZAÇÃO ESPECÍFICO RESULTANTE DA COMPRA.

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](http://www.qiagen.com) ou podem ser pedidos à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

#### **Acordo de licença limitada**

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

1. O kit *artus* CMV LC PCR só pode ser usado de acordo com o *Manual do Kit artus CMV LC 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 CMV LC PCR* e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em [www.qiagen.com](http://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, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2007-2014 QIAGEN, todos os direitos reservados.

[www.qiagen.com](http://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)

1046903PT 148051746



Sample & Assay Technologies