



# Manual do kit *artus*<sup>®</sup> HI Virus- 1 RG RT-PCR

 24 (n.º de catálogo 4513263)  
 96 (n.º de catálogo 4513265)

Versão 1



Diagnóstico in vitro quantitativo

Para utilização com instrumentos Rotor-Gene<sup>®</sup> Q



4513263, 4513265



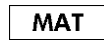
1049310PT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724

Hilden, ALEMANHA

R5



1049310PT



## **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](http://www.qiagen.com).



# Índice

<b>Conteúdo do Kit</b>	<b>6</b>
<b>Símbolos</b>	<b>6</b>
<b>Conservação</b>	<b>7</b>
<b>Utilização prevista</b>	<b>7</b>
<b>Limitações da utilização do produto</b>	<b>8</b>
<b>Avisos e precauções</b>	<b>8</b>
<b>Controlo da qualidade</b>	<b>9</b>
<b>Introdução</b>	<b>10</b>
Princípio	10
Informação sobre o agente patogénico	10
Características de desempenho	11
<b>Equipamentos e reagentes não fornecidos</b>	<b>21</b>
<b>Notas Importantes</b>	<b>22</b>
Precauções gerais	22
Colheita, armazenamento e transporte de amostras	22
Isolamento de ARN	24
Controlo interno	25
Definição do limite para a análise por PCR	25
Quantificação	26
<b>Protocolo: PCR e análise de dados</b>	<b>27</b>
<b>Guia para a resolução de problemas</b>	<b>37</b>
<b>Referências</b>	<b>40</b>
<b>Informações para encomenda</b>	<b>41</b>

## Conteúdo do Kit

<b>artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kit</b>		<b>(24)</b>	<b>(96)</b>
<b>N.º de catálogo</b>		<b>4513263</b>	<b>4513265</b>
<b>Número de reações</b>		<b>24</b>	<b>96</b>
Azul	HI Virus-1 RG Master A	2 x 12 reações	8 x 12 reações
Violeta	HI Virus-1 RG Master B	2 x 12 reações	8 x 12 reações
Vermelho	HI Virus-1 RG QS1* (1x 10 <sup>4</sup> IU/μl)	<b>QS</b> 200 μl	200 μl
Vermelho	HI Virus-1 RG QS 2* (1x 10 <sup>3</sup> IU/μl)	<b>QS</b> 200 μl	200 μl
Vermelho	HI Virus-1 RG QS 3* (1x 10 <sup>2</sup> IU/μl)	<b>QS</b> 200 μl	200 μl
Vermelho	HI Virus-1 RG QS 4* (1x 10 <sup>1</sup> IU/μl)	<b>QS</b> 200 μl	200 μl
Verde	HI Virus-1 RG IC†	<b>IC</b> 1000 μl	2 x 1000 μl
Branco	Água (grau PCR)	1000 μl	1000 μl
	Manual	 1	1

\* Padrão de quantificação.

† Controlo interno.

## Símbolos



<N>

Contém reagentes suficientes para <N> testes



Prazo de validade













Dispositivo médico para diagnóstico in vitro



Número de catálogo



Número do lote

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

## Conservação

Os componentes do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR devem ser armazenados entre  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  e são estáveis até ao prazo de validade impresso no rótulo. Deve evitar-se repetir o processo de descongelamento e congelamento (>2 vezes), uma vez que pode reduzir a sensibilidade do ensaio. Se os reagentes se destinarem a ser usados de forma intermitente, devem ser congelados em alíquotas. O armazenamento a  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  não pode exceder um período de 5 horas.

## Utilização prevista

O kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR é um teste de amplificação de ácidos nucleicos in vitro para a quantificação de ARN do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (VIH-1) no plasma humano. Este kit de teste diagnóstico utiliza reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) e está configurado para ser utilizado com instrumentos Rotor-Gene Q. O teste pode quantificar o ARN do VIH-1 no intervalo de  $120 - 1 \times 10^8$  VIH-1 IU/ml. As

amostras de plasma contendo os subtipos A–H do grupo M foram validadas para utilização no ensaio.

**i** O kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR não pode ser usado com instrumentos Rotor-Gene Q 2plex.

O kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR destina-se a ser usado juntamente com apresentação clínica e outros marcadores de laboratório para prognóstico de doença e para utilização como auxiliar na avaliação da resposta viral ao tratamento antirretroviral, quantificada com base nos níveis de ARN do VIH-1 em plasma tratado com EDTA. O kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR não foi concebido para utilização como teste de despistagem do VIH ou como um teste diagnóstico para confirmar a presença de infeção pelo VIH.

## Limitações da utilização do produto

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

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

Para resultados de PCR 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.

## Avisos e precauções

Ao trabalhar com produtos químicos, usar sempre equipamento de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (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.

## **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* HI Virus-1 RG RT-PCR são testados face a especificações predeterminadas, para garantir uma qualidade constante do produto.



## Introdução

O kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR é um sistema pronto a utilizar para a detecção de ARN do VIH-1 através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em instrumentos Rotor--Gene Q. Os HI Virus-1 RG Master A e B contêm reagentes e enzimas para a transcrição reversa e a amplificação específica de uma região de 93 pb do genoma do VIH-1 e para a detecção direta de fragmentos amplificados específicos no canal de fluorescência Cycling Green do Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene 6000 ou Cycling A.FAM™ (fonte 470 nm, detetor 510 nm) do Rotor-Gene 3000.

Ao mesmo tempo, o kit *artus* HI Virus-1 RG RT-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 ou Rotor-Gene 6000, ou A.ROX™ (fonte 585 nm, detetor 610 nm) do Rotor-Gene 3000. O limite de detecção da RT-PCR do VIH-1 (ver "Sensibilidade analítica", na página 11) não é reduzido. São fornecidos controlos positivos externos (HI Virus-1 RG QS 1–4) que permitem a determinação da quantidade de ARN viral. Para mais informações, consulte "**Quantificação**", na página 26.

## Princípio

A detecção 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 detecção e quantificação do produto que se acumula sem ter de reabrir os tubos de reação após o ensaio de PCR.\*

## Informação sobre o agente patogénico

O vírus da imunodeficiência humana (VIH) é um retrovírus que provoca a síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA). Há dois tipos de VIH responsáveis por infeções humanas, o VIH-1 e o VIH-2, que diferem em termos de virulência e prevalência. A maior parte dos casos de SIDA relatados em todo o mundo foram atribuídos ao VIH-1. A infeção com VIH ocorre através da transferência de sangue infetado, fluido vaginal, leite materno e outros fluidos corporais. Nestes fluidos corporais, o VIH está presente tanto sob a forma de partículas livres de vírus como de vírus nas células imunitárias infetadas. As três principais vias de transmissão são relações sexuais desprotegidas, agulhas

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

contaminadas e transmissão de mãe infetada para filho na altura do nascimento ou através do leite materno.

O VIH infeta sobretudo células do sistema imunitário humano, como sejam os linfócitos T auxiliares (especificamente, CD4<sup>+</sup>). A infeção por VIH leva a baixos níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Quando o número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> desce para além de um nível crítico, a imunidade celular perde-se e o corpo torna-se cada vez mais suscetível a infeções oportunistas.

Os sintomas de SIDA ocorrem numa fase avançada da infeção por VIH, quando o sistema imunitário comprometido não consegue combater as infeções oportunistas. Nesta fase, a pessoa infetada vai desenvolvendo progressivamente os sintomas provocados por essas infeções. As infeções mais comuns incluem diarreia crónica por criptosporidiose, infeção ocular induzida por citomegalovírus, pneumonia pneumocística, toxoplasmose e tuberculose, bem como infeções com membros do complexo *Mycobacterium avium*. Além disso, observa-se frequentemente o desenvolvimento de vários tipos de cancro, como sejam o cancro cervical invasivo, o sarcoma de Kaposi ou o linfoma. Presentemente, não há cura para a SIDA e acredita-se que a maioria das pessoas infetadas com VIH acabe por morrer com uma doença relacionada com a SIDA. Contudo, os avanços nas terapias de VIH/SIDA, incluindo as que combatem o próprio vírus e as que previnem ou tratam as infeções oportunistas, melhoraram significativamente a esperança e a qualidade de vida de muitos doentes com VIH/SIDA.

## Características de desempenho

### Sensibilidade analítica

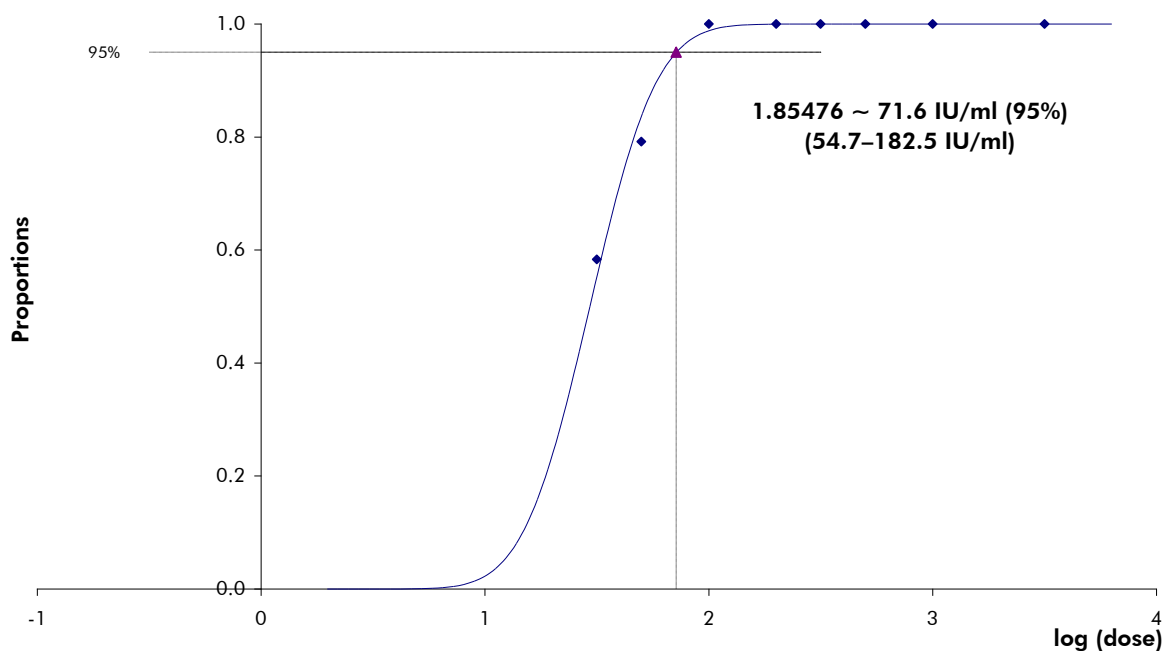
Para o kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR, foi determinado tanto o limite de deteção analítica quanto o limite de deteção analítica relativa à purificação (limites de sensibilidade). O limite de deteção analítica relativa à purificação é determinado através de amostras clínicas positivas para o VIH e de acordo com o método de extração utilizado. O limite de deteção analítica, por sua vez, é determinado independentemente do método de extração selecionado, utilizando um padrão com uma concentração conhecida.

Para determinar a sensibilidade analítica do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR, foi criada uma série de diluições padrão de 0,0316 a aproximadamente 31,6 IU\*/µl, tendo sido, em seguida, analisada no Rotor-Gene 3000 em conjunto com o kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. As análises foram efetuadas em 3 dias diferentes em 8 replicações. Os resultados foram determinados por análise de probit. O limite de deteção analítica do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR em conjunto com o Rotor-Gene 3000 é 4,5 IU/µl ( $p = 0,05$ ). Isto significa

\* O padrão aqui utilizado é um ARN transcrito in vitro, cuja concentração foi calibrada de acordo com o 2º padrão internacional para o VIH (OMS).

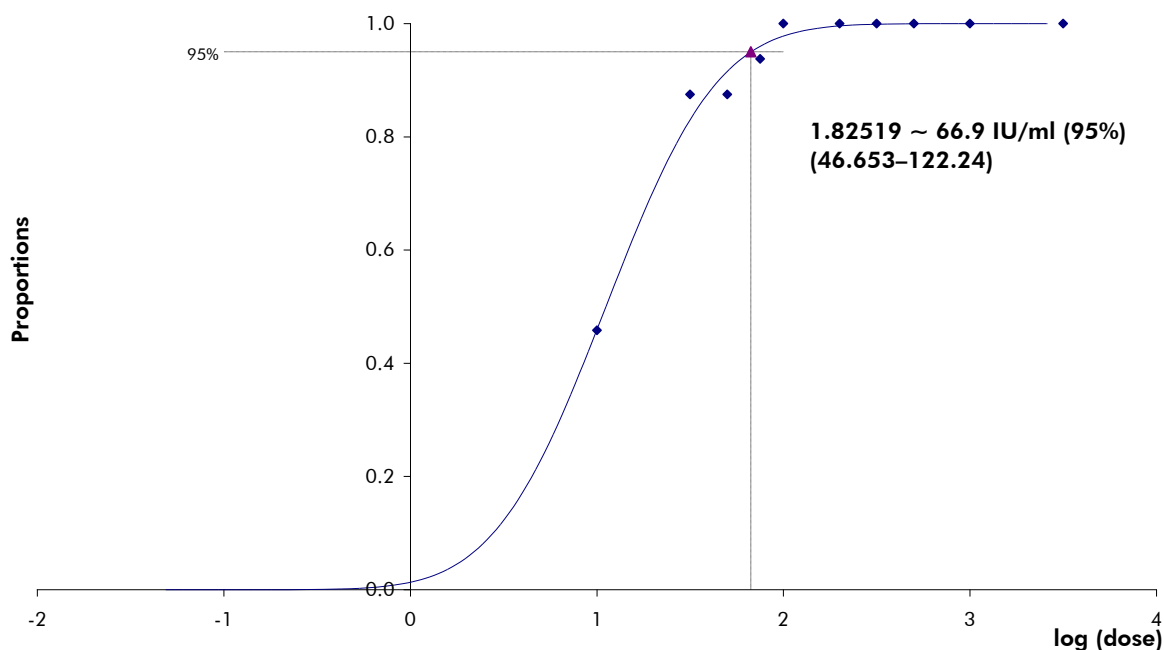
que existe uma probabilidade de 95% de o limite 4,5 IU/ $\mu$ l ser detetado.

A sensibilidade analítica relativa à purificação (kit QIAamp<sup>®</sup> DSP Virus, QIAGEN) do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR em instrumentos Rotor-Gene foi determinada com recurso a uma série de diluições do 2<sup>o</sup> padrão internacional da OMS de ARN do VIH-1 para ensaios com técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NAT) (código 97/650 do NIBSC), de 10 a 3160 IU/ml de VIH em amostras de plasma clínicas. Estas foram sujeitas a extração de ARN utilizando o kit QIAamp DSP Virus (QIAGEN, volume de extração: 0,5 ml, volume de eluição: 25  $\mu$ l). Cada uma das diluições foi analisada com kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR em 3 dias diferentes em 8 replicações. Os resultados foram determinados por análise de probit. A figura 1 representa uma ilustração gráfica da análise de probit. O limite de deteção analítica relativa à purificação do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR em conjunto com o Rotor-Gene 3000 é de 71,6 IU/ml ( $p = 0,05$ ). Isto significa que existe uma probabilidade de 95% de o limite 71,6 IU/ml ser detetado.



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

O limite de deteção analítica relativa à purificação do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR em conjunto com o Rotor-Gene 6000 é de 66,9 IU/ml ( $p = 0,05$ ). Isto significa que existe uma probabilidade de 95% de o limite 66,9 IU/ml ser detetado.



**Figura 2. Análise de probit: HI Virus-1 (Rotor-Gene 6000).** Sensibilidade analítica relativa à purificação (Kit QIAamp DSP Virus, QIAGEN) do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR no Rotor-Gene 6000.

## Especificidade

A especificidade do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR é, antes de mais, assegurada pela seleção dos iniciadores (primers) e sondas, bem como pela seleção de condições de reação rigorosas. 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 todos os genótipos relevantes foi assim assegurada por um alinhamento da base de dados e por um ensaio de PCR nos instrumentos Rotor-Gene com os seguintes genótipos (ver a tabela 1).

Além disso, a especificidade foi validada com 100 amostras diferentes de plasma negativo para VIH. Estas não geraram quaisquer sinais com os primers e sondas específicos do VIH que estão incluídos no HI Virus-1 RG Master.

Foi também testada a possibilidade de reações cruzadas do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR usando o grupo de controlo listado na tabela 2. Nenhum dos agentes patogénicos testados demonstrou reatividade. Não ocorreram reações cruzadas com infeções mistas.

**Tabela 1. Teste da especificidade dos genótipos relevantes.**

<b>Vírus</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Fonte</b>	<b>VIH (FAM)</b>	<b>Controlo interno (ROX)</b>
Vírus da IH-1	A	NIBSC*	+	+
Vírus da IH-1	B	NIBSC	+	+
Vírus da IH-1	C	NIBSC	+	+
Vírus da IH-1	D	NIBSC	+	+
Vírus da IH-1	E	NIBSC	+	+
Vírus da IH-1	F	NIBSC	+	+
Vírus da IH-1	G	NIBSC	+	+
Vírus da IH-1	H	NIBSC	+	+

\* National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire (instituto nacional de padrões e controlos biológicos, Hertfordshire).

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

<b>Grupo de controlo</b>	<b>VIH (Cycling Green ou Cycling A.FAM)</b>	<b>Controlo interno (Cycling Orange ou Cycling A.ROX)</b>
Vírus da Hepatite A	-	+
Vírus da hepatite B	-	+
Vírus da Hepatite C	-	+
Vírus do herpes humano tipo 1 (vírus herpes simplex 1)	-	+
Vírus do herpes humano tipo 2 (vírus herpes simplex 2)	-	+
Vírus do herpes humano tipo 3 (vírus varicela zóster)	-	+
Vírus do herpes humano tipo 5	-	+

(citomegalovírus)

A tabela continua na página seguinte

**Tabela 2. Continuação**

<b>Grupo de controlo</b>	<b>VIH (Cycling Green ou Cycling A.FAM)</b>	<b>Controlo interno (Cycling Orange ou Cycling A.ROX)</b>
Vírus da leucemia de células T humano tipo 1 e tipo 2	-	+
Enterovírus	-	+
Parvovírus B19	-	+
Febre amarela	-	+
<i>Aspergillus flavus</i>	-	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	+
<i>Candida albicans</i>	-	+
<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	+
<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	+
<i>Filobasidiella neoformans</i>	-	+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	+
<i>Pneumocystis carinii</i>	-	+
<i>Staphylococcus</i> sp.	-	+
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+

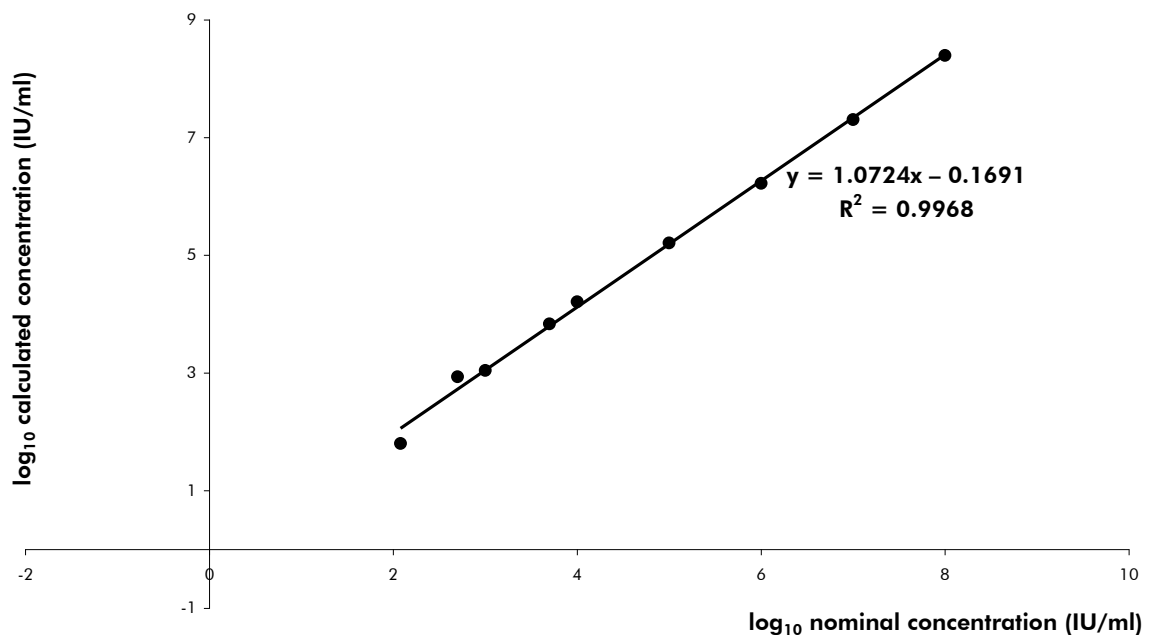
## Intervalo linear

O intervalo linear (medida analítica) do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR foi determinado através da análise de uma série de diluições de um VIH transcrito in vitro de  $1 \times 10^8$  IU/ $\mu$ l a 1 IU/ $\mu$ l. A série de diluições foi previamente calibrada de acordo com padrão internacional da OMS para o ARN do VIH.

Cada diluição foi testada em replicações ( $n = 8$ ) utilizando o kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR em instrumentos Rotor-Gene.

Foi determinado que o intervalo linear do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR abrange concentrações de 5 IU/ $\mu$ l até, no mínimo,  $1 \times 10^8$  IU/ $\mu$ l.

O intervalo linear relativo à purificação do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR foi determinado por análise de uma série de diluições do OptiQuant HIV-1 RNA Quantification Panel de  $1 \times 10^8$  IU/ml a 120 IU/ml. A purificação foi efetuada em duplicado utilizando o kit QIAamp DSP Virus (volume de extração: 0,5 ml, volume de eluição: 25  $\mu$ l). Cada uma das 9 amostras foi analisada usando o kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. O intervalo linear relativo à purificação do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR foi determinado para abranger as concentrações de 120 IU/ml a, pelo menos,  $10^8$  IU/ml (ver a figura 3).



**Figura 3.** Intervalo linear do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. Cálculo do intervalo linear. A linha reta foi determinada por uma regressão linear das concentrações calculadas de  $\log_{10}$  com as concentrações nominais de  $\log_{10}$ . A equação da linha de regressão está incluída na figura.

## Precisão

Os dados de precisão do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-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* HI Virus-1 RG RT-PCR foram recolhidos utilizando o padrão de quantificação com a menor concentração (QS 4; 10 IU/ $\mu$ 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 3). Tendo por base estes resultados, a dispersão estatística global de uma dada amostra com a concentração referida é de 1,66% ( $C_T$ ), e 2,15% ( $C_T$ ) para a deteção do controlo interno. Estes valores baseiam-se na totalidade de todos os valores individuais das variabilidades determinadas.

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

	<b>Valor <math>C_T</math></b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Coefficiente de variação (%)</b>
Variabilidade intra-ensaio: HI Virus-1 RG QS 4	35,62	0,45	1,26
Variabilidade intra-ensaio: Controlo interno	31,24	0,18	0,58
Variabilidade entre ensaios: HI Virus-1 RG QS 4	35,75	0,56	1,55
Variabilidade entre ensaios: Controlo interno	31,65	0,36	1,13
Variabilidade entre lotes: HI Virus-1 RG QS 4	35,40	0,61	1,73



Variabilidade entre lotes: Controlo interno	31,20	0,55	1,76
Variância total: HI Virus-1 RG QS 4	35,58	0,59	1,66
Variância total: Controlo interno	31,40	0,67	2,15

## Robustez

A verificação da robustez permite apurar a taxa total de erro do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. Para isso, foram misturadas 100 amostras de plasma negativas para o VIH com 4,5 IU/ $\mu$ l por volume de eluição de ARN de controlo do VIH (aproximadamente três vezes a concentração dos limites de sensibilidade analíticos). Após a extração utilizando o kit QIAamp DSP Virus, estas amostras foram analisadas com o kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. A taxa de erro foi de 0% para a totalidade das amostras de VIH. A robustez do controlo interno foi verificada adicionalmente através da purificação e da análise de 100 amostras de plasma negativas para o VIH. A taxa total de erro foi de 0%. Não foram observadas inibições. Deste modo, a robustez do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR é de  $\geq 99\%$ .

## Reprodutibilidade

Os dados de reprodutibilidade permitem uma avaliação regular do desempenho do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR, bem como uma comparação de eficiência com outros produtos. Estes dados foram obtidos pela participação nos programas de competência estabelecidos.

## Avaliação diagnóstica

O kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR foi avaliado num estudo. Ao comparar o kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR com o teste COBAS<sup>®</sup> TaqMan<sup>®</sup> HIV-1, 241 amostras clínicas de plasma foram analisadas retrospectivamente. Todas as amostras haviam sido previamente analisadas positivas ou negativas utilizando o teste COBAS TaqMan HIV-1 para diagnóstico de rotina.

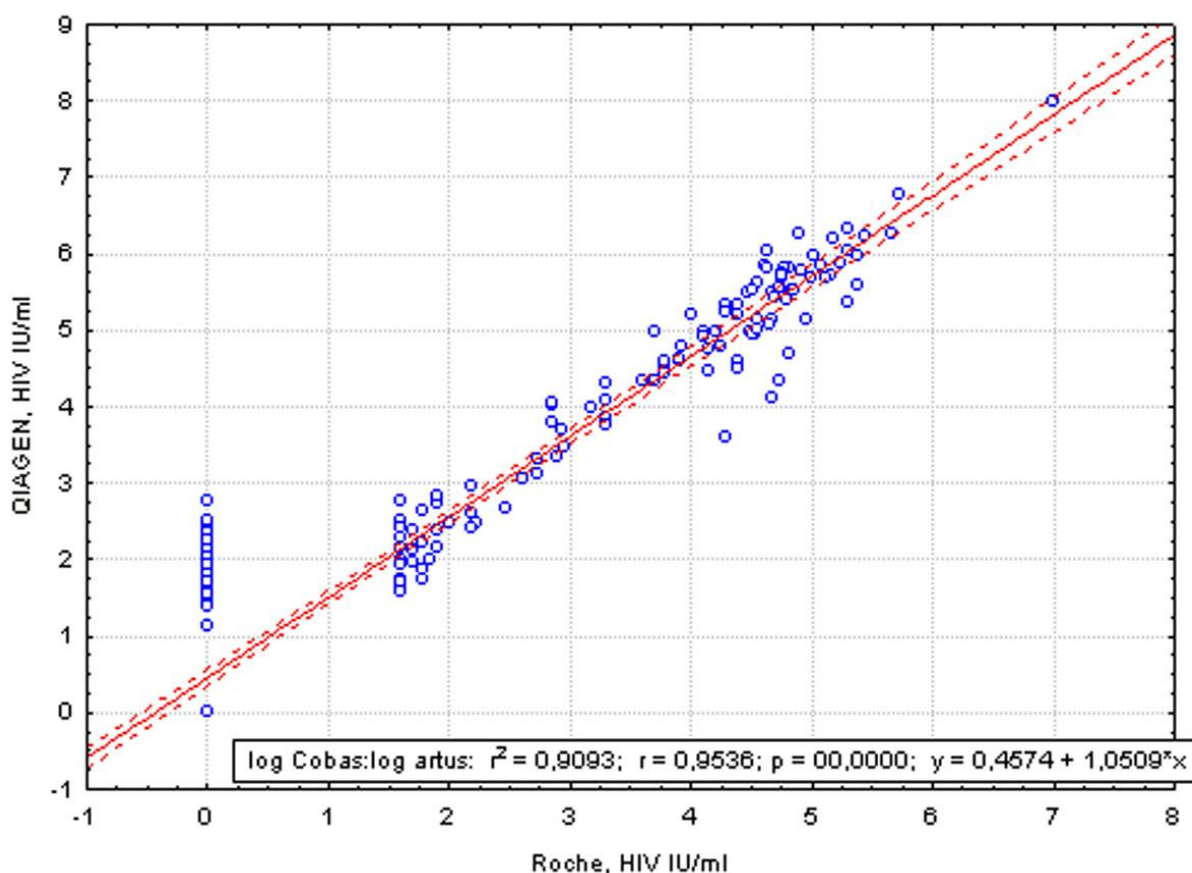
O isolamento de ARN de VIH para análise do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR foi feito utilizando o kit QIAamp DSP Virus, tendo a análise sido efetuada no instrumento Rotor-Gene 6000. Para a análise comparativa com o teste COBAS TaqMan HIV-1, o ARN de VIH foi isolado de acordo com as instruções do fabricante fornecidas no folheto informativo da embalagem. Os resultados obtidos com o kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR foram comparados com os obtidos com o teste COBAS TaqMan HIV-1 (ver a tabela 4 e a figura 4).

105 das 126 amostras que se revelaram positivas com o teste COBAS TaqMan HIV-1 também se revelaram positivas com o kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR.  
113 das 115 amostras que se revelaram negativas com o teste COBAS TaqMan HIV-1 também se revelaram negativas com o kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR.

Se os resultados obtidos com o teste COBAS TaqMan HIV-1 forem considerados como referência, a sensibilidade de diagnóstico é de 98,1% e a especificidade de diagnóstico é de 84,3%.

**Tabela 4. Resultados das 241 amostras de plasma com EDTA retrospectivas analisadas**

		Teste COBAS TaqMan HIV-1		
		+	-	Total
<b>Kit <i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-PCR</b>	+	105	21	126
	-	2	113	115



**Figura 4.** Comparação do teste COBAS TaqMan HIV-1 (Roche, VIH; com purificação de amostras utilizando o sistema COBAS AmpliPrep) com o kit ***artus* HI Virus-1 RG RT-PCR** (QIAGEN, VIH; com purificação de amostras utilizando o kit QIAamp DSP Virus). A correlação dos resultados quantitativos dos dois sistemas (tabela 4) de teste foi analisada através de uma regressão linear. Os resultados de ambos os kits são mostrados num gráfico XY (dispersão) com escala logarítmica .

## Equipamentos e reagentes não fornecidos

Ao trabalhar com produtos químicos, usar sempre equipamento de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (SDS) adequadas, disponíveis junto do fornecedor do produto.

- Kit de isolamento de ARN (ver “**Isolamento de ARN**” na página 24)
- Pipetas (ajustáveis)\*
- Pontas de pipetas estéreis com filtros
- Misturador vórtex\*
- Centrífuga de bancada\* com rotor para tubos de ensaio de 2 ml
- Instrumento Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene\* com canais de fluorescência para Cycling Green e Cycling Orange ou com canais de fluorescência para Cycling A.FAM e Cycling A.ROX
- Rotor-Gene Q, versão de software 1.7.94 (Rotor-Gene 6000, versão de software 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; Rotor-Gene 3000, versão de software 6.0.23) ou posterior
- Strip Tubes and Caps (Tiras de tubos e tampas), 0,1 ml, para utilização com o rotor de 72 poços (n.º cat. 981103 ou 981106)
- Em alternativa: PCR Tubes (tubos de PCR), 0,2 ml, para utilização com o rotor de 36 poços (n.º cat. 981005 ou 981008)
- Bloco de refrigeração (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes [bloco de carregamento 72 tubos de 0,1 ml], n.º cat. 9018901, ou Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes [bloco de carregamento 96 tubos de 0,2 ml], n.º cat. 9018905)

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

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

# Notas Importantes

## 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).

## Colheita, armazenamento e transporte de amostras

**i** Todas as amostras devem ser manuseadas como potencialmente infecciosas.

São apenas permitidos os seguintes materiais de amostra, para os quais têm de ser rigorosamente observadas as seguintes regras e instruções relativas à colheita, transporte e armazenamento.

**i** Os estudos atuais apontam o plasma tratado com EDTA ou citrato como os materiais de amostra mais adequados para deteção do VIH. Por isso, recomenda-se a utilização destes materiais com o kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR.

A validação interna do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR foi efetuada usando amostras de plasma humano tratado com EDTA. Não existem outras amostras validadas. Utilizar apenas o kit de isolamento de ARN recomendado (ver “**Isolamento de ARN**”, na página 24) para a preparação das amostras.

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

### Colheita de amostras

Toda colheita de sangue leva a uma lesão dos vasos sanguíneos (artérias, veias, capilares). Devem apenas ser usados materiais inócuos e estéreis. Estão

disponíveis materiais descartáveis para colheita de sangue. Para a punção de veias, não se devem utilizar agulhas muito finas. A colheita de sangue venoso deve ser feita em locais adequados na região da dobra do cotovelo, do antebraço ou do dorso da mão. O sangue deve ser colhido em tubos de amostra padrão (tampa vermelha, Sarstedt ou tubos equivalentes de outros fabricantes). Deve ser colhido um volume de 5-10 ml de sangue tratado com EDTA. Inverter os tubos diretamente após colheita da amostra (8 vezes, não agitar).

**i** Não devem ser usadas amostras de indivíduos tratados com heparina (consulte “Substâncias interferentes”, na página 23).

### **Armazenamento de amostras**

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

### **Transporte de amostras**

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

As amostras devem ser enviadas no prazo de 6 horas. A conservação no local da colheita não é recomendada. É possível enviar as amostras por correio, de acordo com os regulamentos para o transporte de material patogénico. Recomenda-se o transporte da amostra por serviços de correio expresso. As amostras de sangue devem ser enviadas refrigeradas (2–8 °C), enquanto que o plasma separado deve ser enviado congelado (–15 a –30 °C).

### **Substâncias interferentes**

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

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

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

## Isolamento de ARN

O kit QIAamp DSP Virus (QIAGEN, n.º cat. 60704) está validado para purificação de ARN viral obtido de plasma humano para utilização com o kit *artus HI Virus-1 RG RT-PCR*. Realizar a purificação de ARN viral em conformidade com as instruções constantes do *Manual do Kit QIAamp DSP Virus*.

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

Antes de iniciar cada extração, deverá ser preparada no momento uma mistura de tampão de lise e ARN transportador (e controlo interno, quando aplicável, ver "Controlo interno" abaixo) de acordo com o esquema de pipetagem indicado na tabela 5.

**Tabela 5. Esquema de pipetagem para utilização com o kit QIAamp DSP Virus**

Número de amostras	1	12
Tampão de lise† (AL)*	550 µl	6600 µl
ARN transportador (1 µg/µl)	6,2 µl	74,4 µl
<b>Volume total</b>	<b>556,2 µl</b>	<b>6674,4 µl</b>
<b>Volume por extração</b>	<b>500 µl</b>	<b>500 µl cada</b>

\* Contém hidrocloreto de guanidina; consultar informações sobre segurança no *Manual do kit QIAamp DSP Virus*.

**i** Usar a recém preparada mistura de tampão de lise e ARN transportador imediatamente para extração. Não é possível conservar a mistura.

**i** O controlo interno do kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR pode ser utilizado diretamente no procedimento de isolamento (ver “**Controlo interno**” abaixo).

## Controlo interno

É fornecido um controlo interno (HI Virus-1 RG IC). Isto permite ao utilizador controlar o procedimento de isolamento de ARN e verificar a possível inibição da PCR. Para este fim, adicionar o controlo interno numa relação de 0,1  $\mu$ l por 1  $\mu$ l do volume de eluição no isolamento. Por exemplo, ao utilizar o kit QIAamp DSP Virus, o ARN é eluído em 60  $\mu$ l de tampão de eluição (AVE). Daí que, devem ser inicialmente adicionados 6  $\mu$ l de controlo interno.

**i** O controlo interno e ARN transportador (ver “**Isolamento de ARN**”, página 24) só devem ser adicionados à mistura de tampão de lise e amostra ou diretamente ao tampão de lise.

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

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

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 HI Virus-1 RG Master A e HI Virus-1 RG Master B, tal como descrito no passo 2b do protocolo (página 28).

## Definição do limite para a análise por PCR

As definições de limiar ideal para uma determinada combinação do instrumento Rotor-Gene Q e do kit *artus* RG PCR devem ser empiricamente configuradas, testando cada combinação individual, uma vez que se trata de um valor relativo que depende do processo de diagnóstico geral. Como ponto de partida, o limite pode ser definido num valor preliminar de 0,04 para a análise do primeiro procedimento de ensaio de PCR, mas este valor deve ser redefinido numa análise comparativa dos procedimentos de análise seguintes do processo. O limite deve ser definido manualmente mesmo acima do sinal de fundo dos controlos negativos e amostras negativas. O valor limite médio calculado a partir destas experiências irá certamente funcionar para a maioria dos procedimentos de ensaio futuros, mas o utilizador deve, contudo, rever em intervalos regulares o valor limite gerado. O valor limite situar-se-á,



normalmente, no intervalo de 0,03–0,05 e deve ser arredondado para não mais do que três casas decimais.

## Quantificação

Os padrões de quantificação fornecidos (HI Virus-1 RG QS 1–4) são tratados como amostras previamente purificadas e utilizados no mesmo volume (20 µl). 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).

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

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

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).

## Fator de conversão

1 IU/ml corresponde a 0,50 cópias/ml para a deteção de ARN do VIH-1 no Rotor-Gene Q em conjunto com a preparação de amostras manual utilizando o kit QIAamp DSP Virus. O fator de conversão é uma aproximação com base num fator médio ao longo do intervalo dinâmico do ensaio.

\* O padrão foi calibrado utilizando o padrão internacional de VIH (OMS).

# Protocolo: PCR e análise de dados



## Pontos importantes antes de iniciar o procedimento

- Antes de dar início ao procedimento, ler “**Notas Importantes**”, páginas 22–26.
- Familiarizar-se com o Rotor-Gene Q antes de dar início ao protocolo. Consultar o manual do utilizador do instrumento.
- Assegurar-se de que, pelo menos, um dos padrões de quantificação e um controlo negativo (água, grau de PCR) são incluídos por ensaio de PCR. Para gerar uma curva padrão, utilizar os 4 padrões de quantificação fornecidos (HI Virus-1 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 ARN 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 25). Neste caso, preparar uma master mix de acordo com a tabela 6.**

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

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

<b>Número de amostras</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
HI Virus-1 RG Master A	12 $\mu$ l	144 $\mu$ l
HI Virus-1 RG Master B	18 $\mu$ l	216 $\mu$ l
HI Virus-1 RG IC	0 $\mu$ l	0 $\mu$ l
<b>Volume total</b>	<b>30 <math>\mu</math>l</b>	<b>360 <math>\mu</math>l</b>

- 2b. O controlo interno tem de ser adicionado diretamente à mistura de HI Virus-1 Master A e HI Virus-1 Master B. Neste caso, preparar uma master mix de acordo com a tabela 7.**

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

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

<b>Número de amostras</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
HI Virus-1 RG Master A	12 $\mu$ l	144 $\mu$ l
HI Virus-1 RG Master B	18 $\mu$ l	216 $\mu$ l
HI Virus-1 RG IC	2 $\mu$ l	24 $\mu$ l
<b>Volume total</b>	<b>32 <math>\mu</math>l*</b>	<b>384 <math>\mu</math>l*</b>

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

- 3. Pipetar 30  $\mu$ l da master mix para cada tubo de PCR. De seguida, adicionar 20  $\mu$ l de ARN da amostra eluída (ver a tabela 8). Da mesma forma, deverão ser utilizados 20  $\mu$ l de, pelo menos, um dos padrões de quantificação (HI Virus-1 RG QS 1–4) como controlo positivo e 20  $\mu$ l de água (água, grau de PCR) como um controlo negativo.**

**Tabela 8. Preparação do ensaio por PCR**

<b>Número de amostras</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
Master mix	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l cada
Amostra	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l cada
<b>Volume total</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>	<b>50 <math>\mu</math>l cada</b>

- 4. Fechar os tubos de PCR. Assegurar que o anel de bloqueio (acessório do instrumento Rotor-Gene) é colocado no topo do rotor para evitar a abertura acidental dos tubos durante o ensaio.**
- 5. Para a detecção de ARN do VIH-1, criar um perfil de temperatura de acordo com os passos a seguir indicados.**

<b>Definição dos parâmetros de ensaio gerais</b>	<b>Figuras 5, 6, 7</b>
<b>Transcrição reversa do ARN</b>	<b>Figura 8</b>
<b>Ativação inicial da enzima de começo quente</b>	<b>Figura 9</b>
<b>Amplificação do ADNc</b>	<b>Figura 10</b>
<b>Ajustar a sensibilidade do canal de fluorescência</b>	<b>Figura 11</b>
<b>Iniciar o ensaio</b>	<b>Figura 12</b>

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

6. Primeiro, começar por abrir a caixa de diálogo “New Run Wizard” (Assistente de novo ensaio) (figura 5). Marcar a caixa “Locking Ring Attached” (Anel bloqueador conectado) e clicar em “Next” (Seguinte).

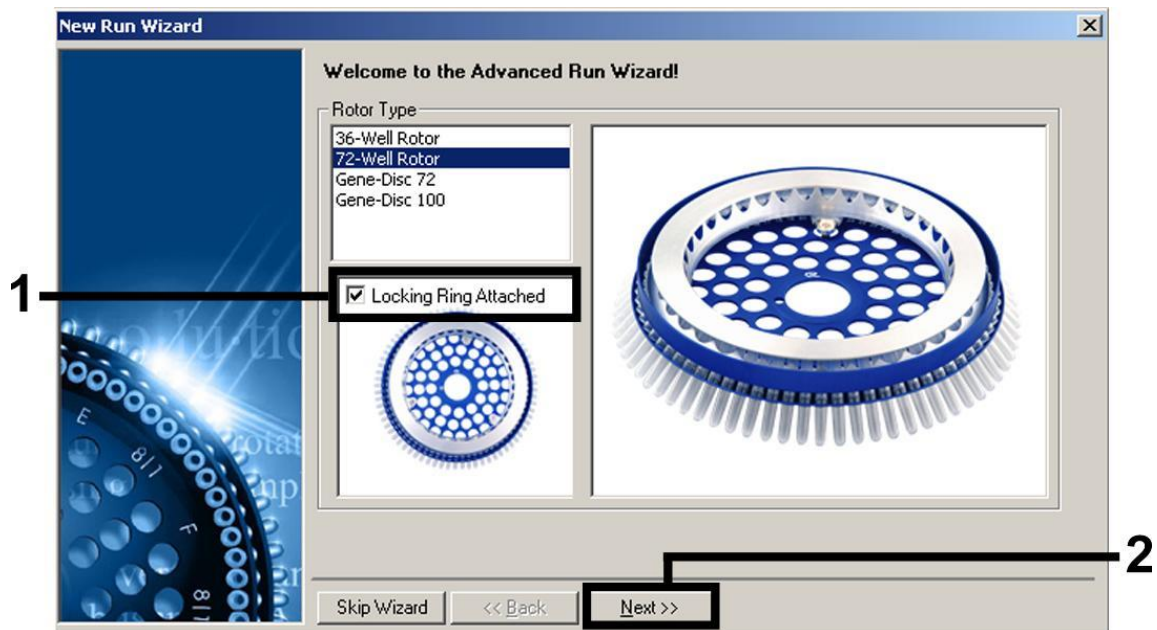


Figura 5. A caixa de diálogo “New Run Wizard”.

7. Selecionar 50 para o volume de reação da PCR e clicar em “Next” (figura 6).

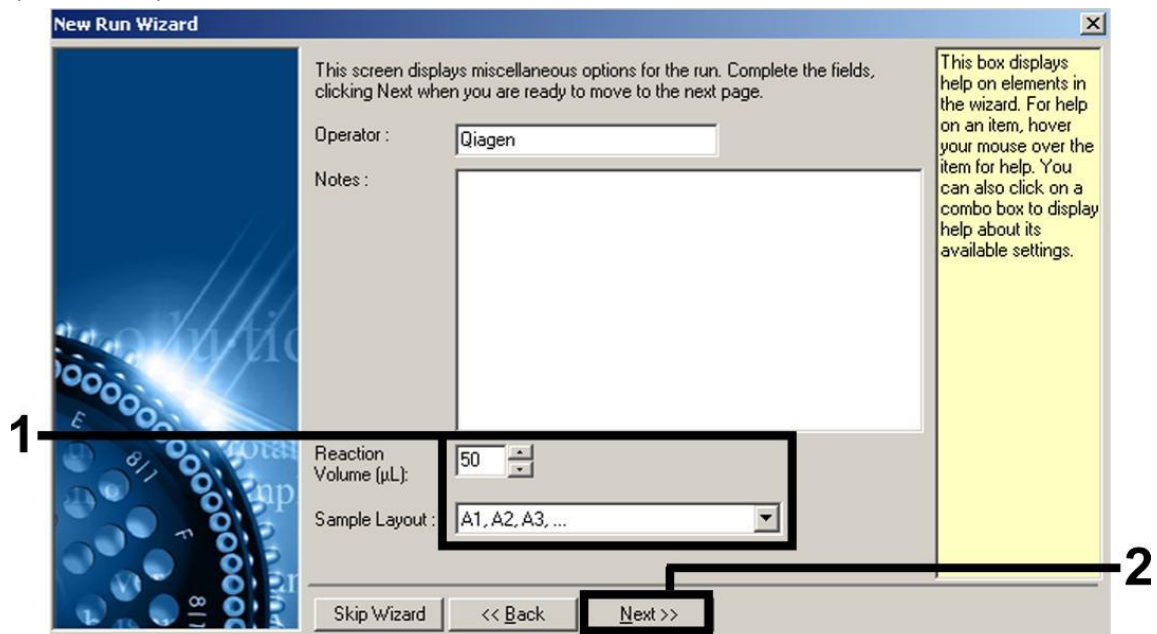


Figura 6 Definição dos parâmetros de ensaio gerais.

8. Clicar no botão "Edit Profile" (Editar perfil) na caixa de diálogo seguinte do "New Run Wizard" (figura 7) e programar o perfil de temperatura conforme se mostra nas figuras 7-10).

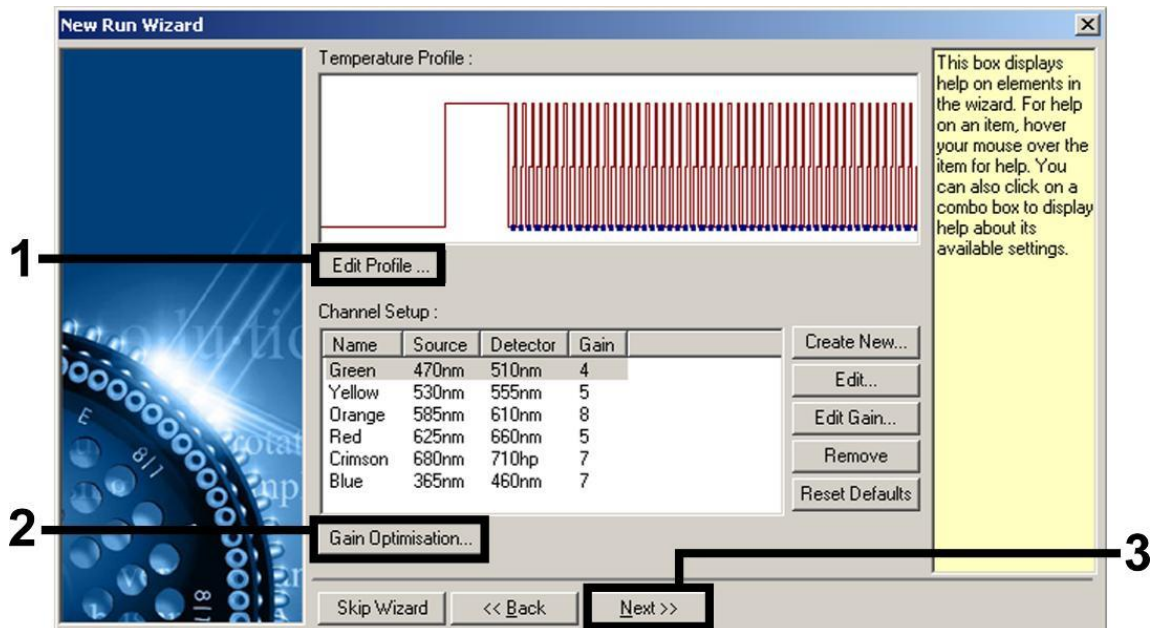


Figura 7 Edição do perfil.

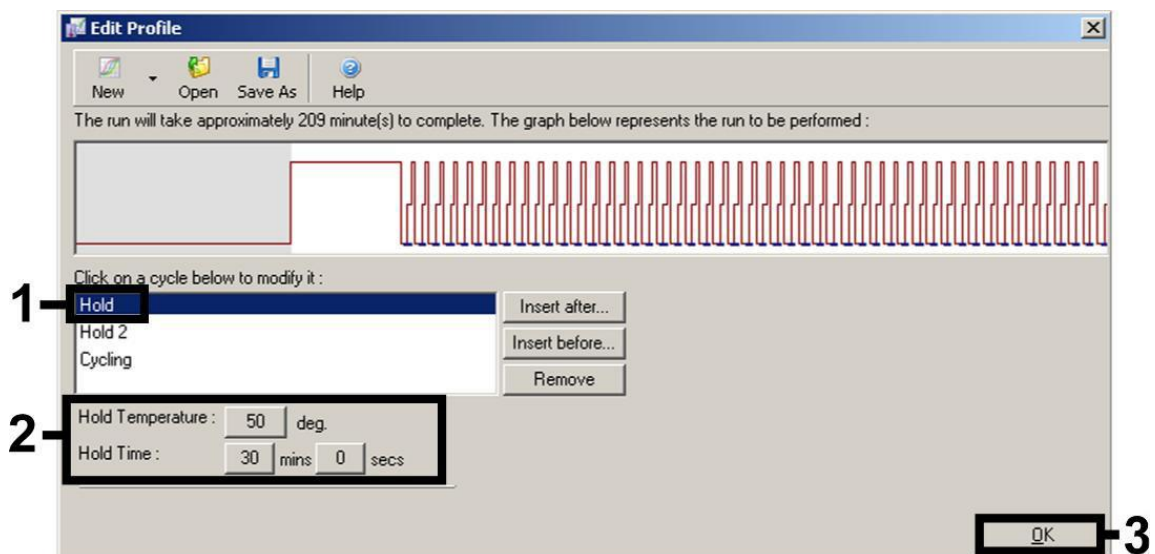
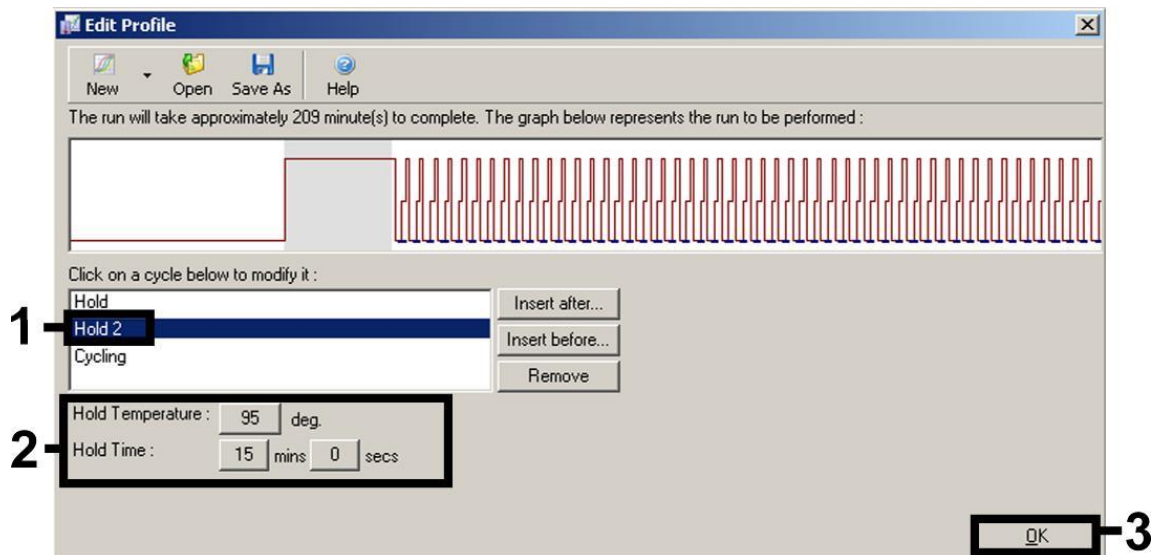
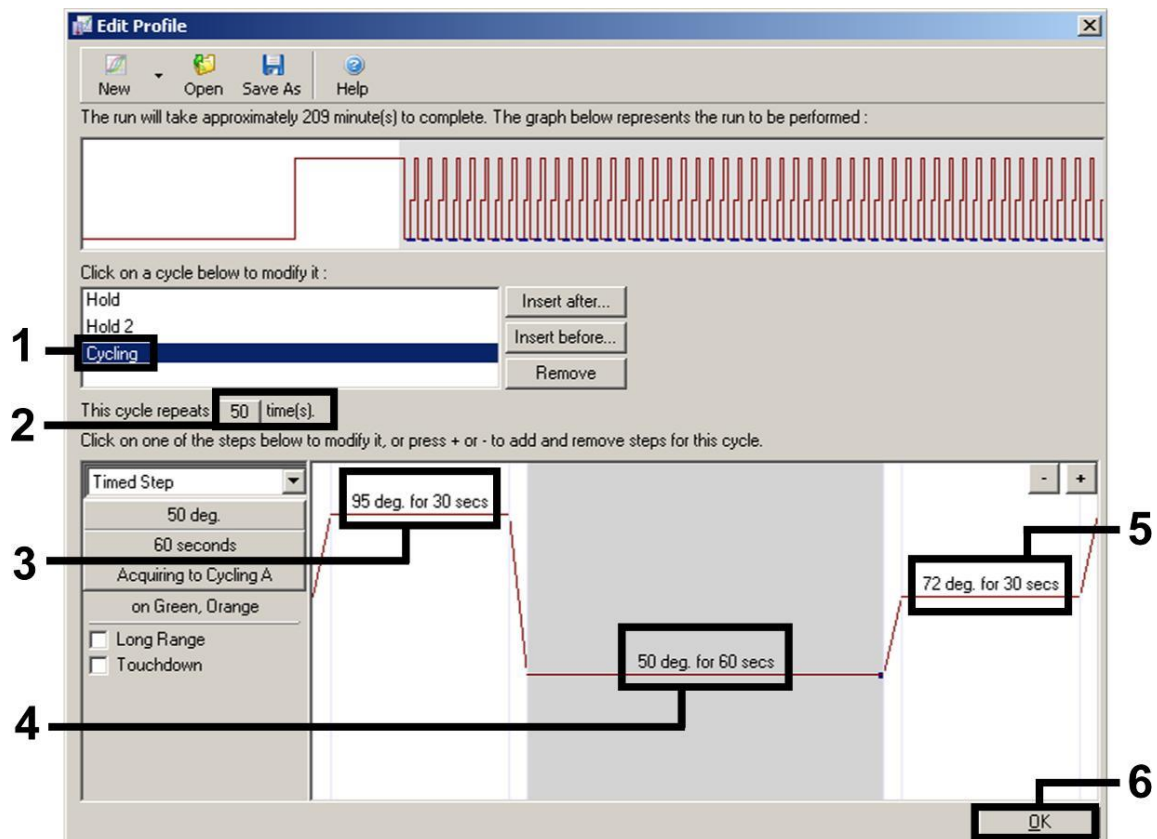


Figura 8. Transcrição reversa do ARN.



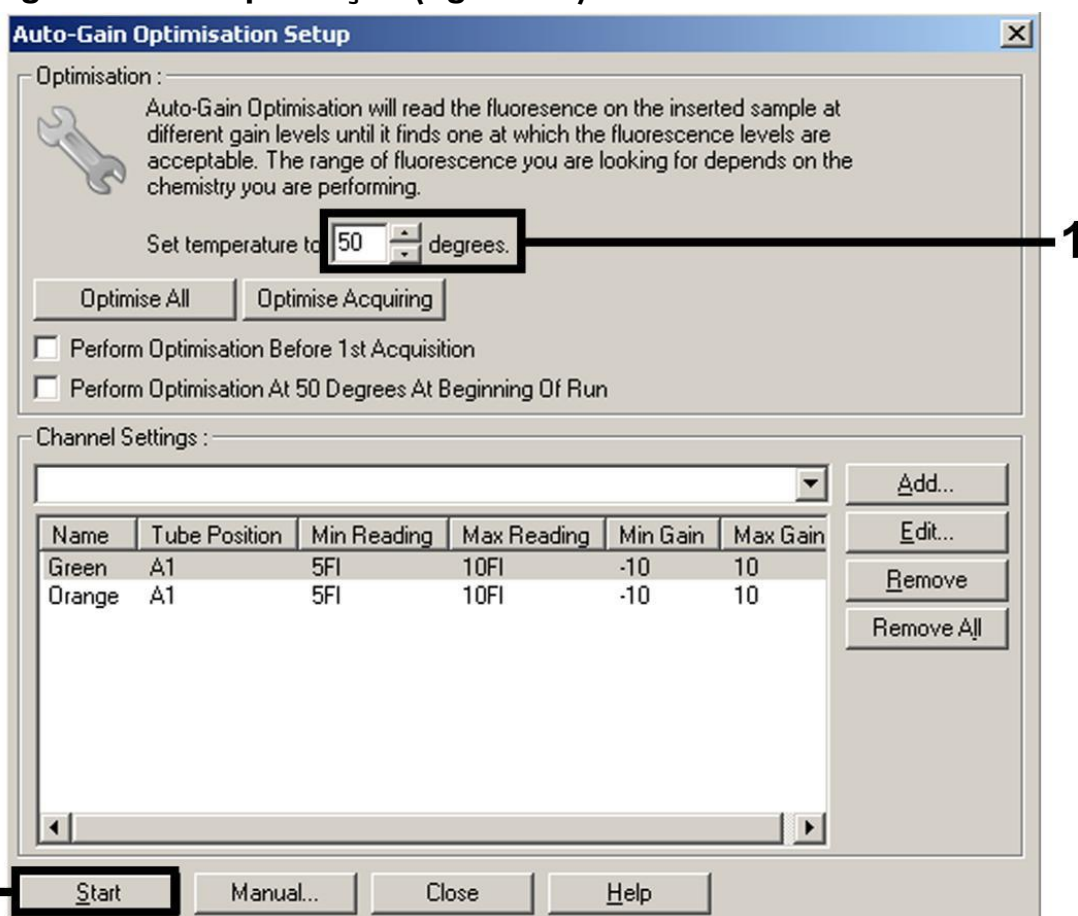
**Figura 9. Ativação inicial da enzima de começo quente.**



**Figura 10 Amplificação do ADNc.** Ter em atenção que, no Rotor-Gene 3000, o software irá definir os corantes fluorescentes como "FAM/Sybr, ROX".

9. O intervalo de deteção 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 7) para abrir a caixa de diálogo "Auto-Gain Optimisation Setup" (Configuração da otimização automática de ganho). Definir a temperatura de

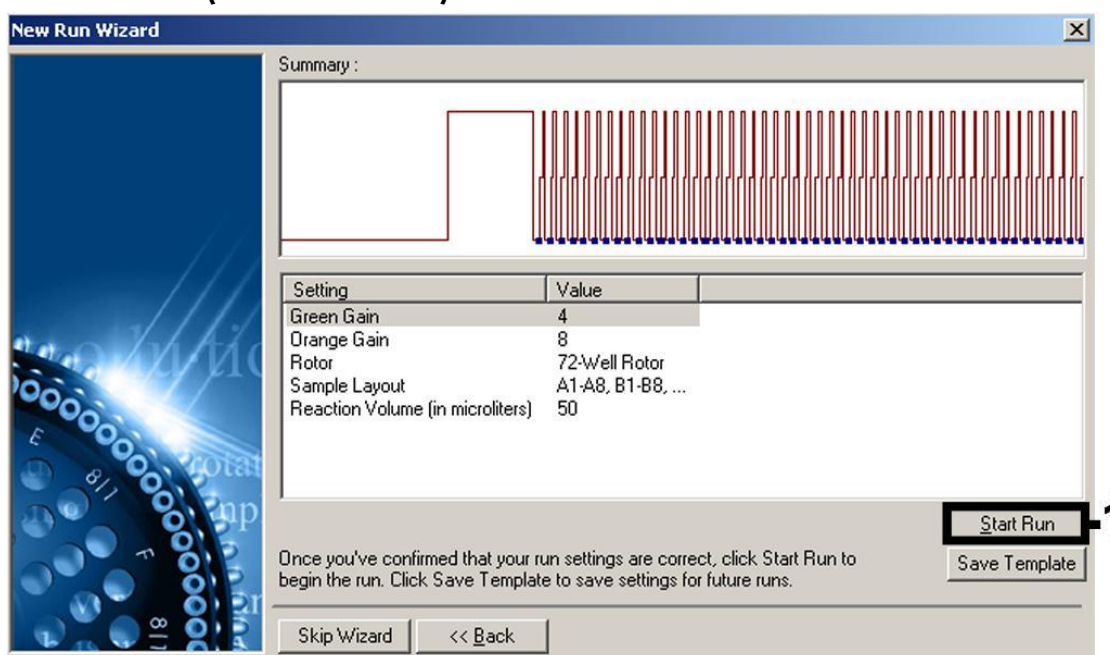
calibração para 50 para igualar a temperatura de hibridização do programa de amplificação (figura 11).



**Figura 11 Ajustar a sensibilidade do canal de fluorescência.** Ter em atenção que, no Rotor-Gene 3000, o software irá definir os corantes fluorescentes como "FAM/Sybr" e "ROX".



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



**Figura 12. Iniciar o ensaio.** Ter em atenção que, no Rotor-Gene 3000, o software irá definir os corantes fluorescentes como “FAM/Sybr” e “ROX”.

### 11. Os seguintes resultados (11a, 11b e 11c) são possíveis.

A figura 13 e a figura 14 apresentam exemplos de reações de PCR positivas e negativas.

A tabela 9 mostra as diretrizes para a interpretação de resultados quantitativos.

#### 11a. É detetado um sinal no canal de fluorescência Cycling Green.

O resultado da análise é positivo: a amostra contém ARN do VIH-1.

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



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

**11b. Não é detetado sinal no canal de fluorescência Cycling Green. Ao mesmo tempo, aparece um sinal do controlo interno no canal Cycling Orange. Na amostra não é detetável ARN do VIH-1. Pode ser considerado negativo.**

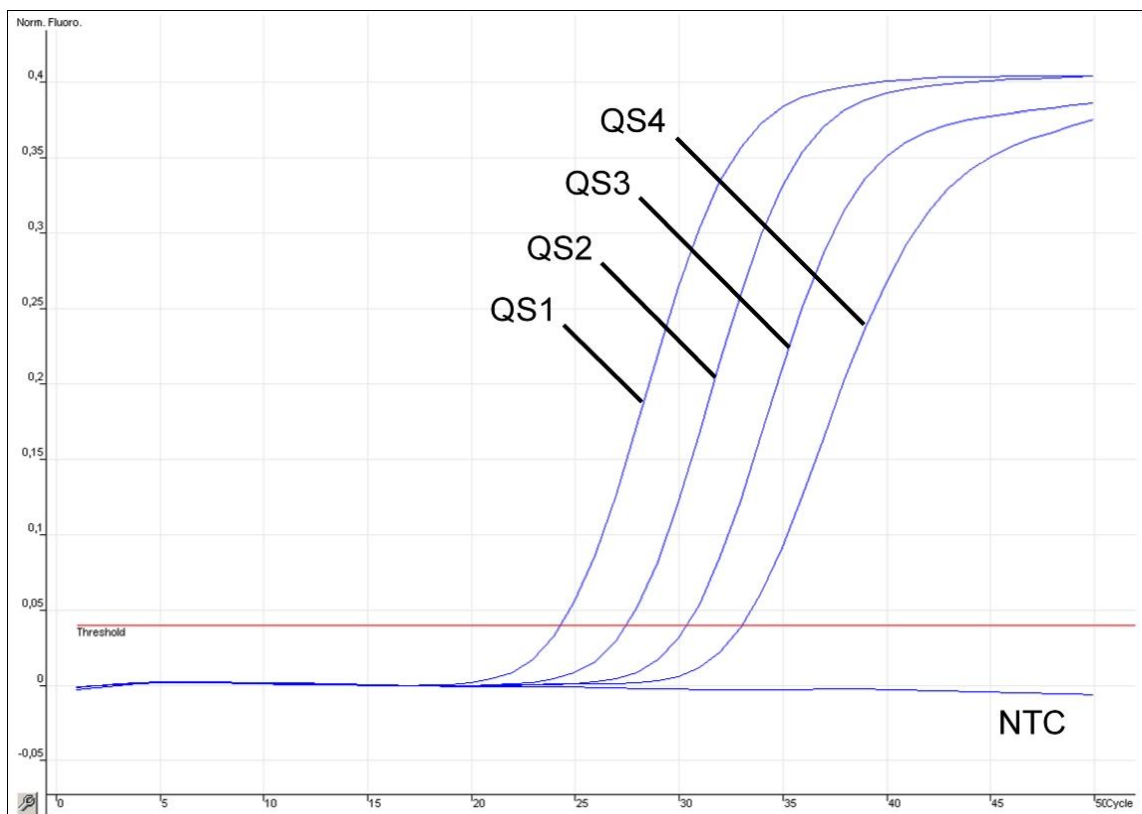
No caso de uma RT-PCR negativa para VIH-1, o sinal detetado do controlo interno exclui a possibilidade de inibição da RT-PCR.

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

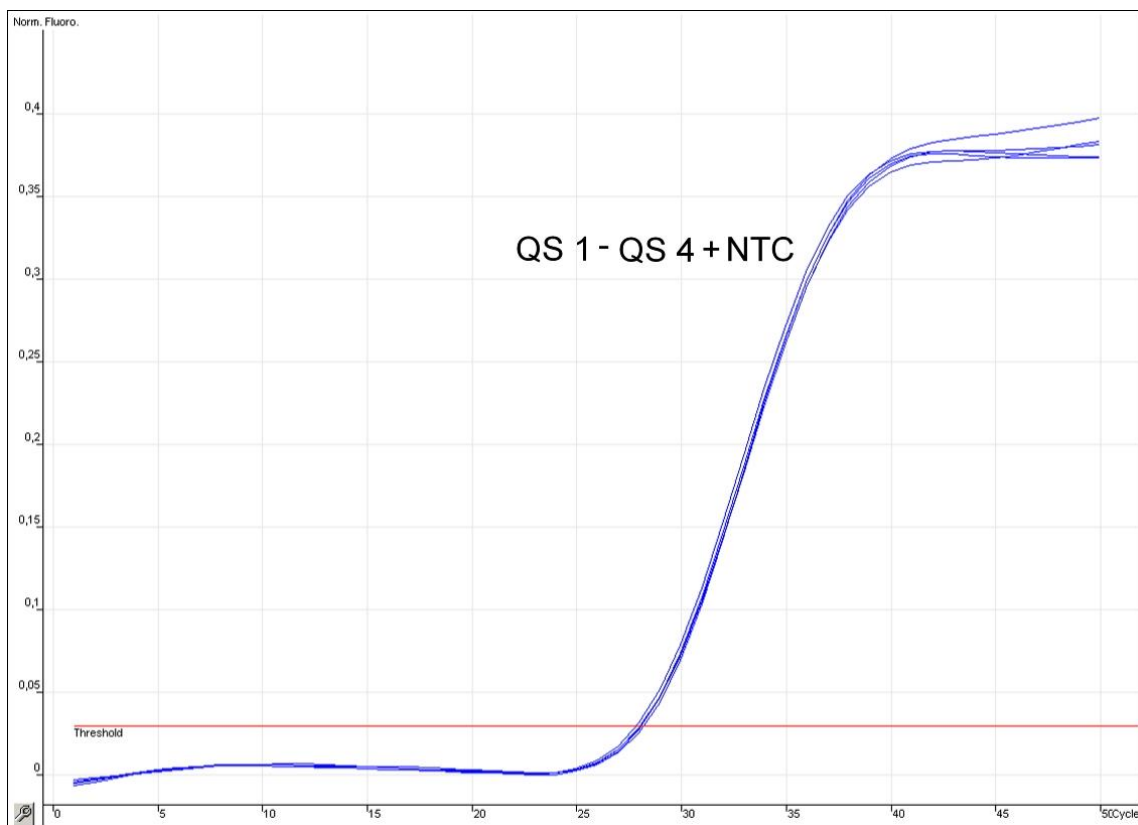
**11c. Não é detetado sinal nos canais Cycling Green ou Cycling Orange. Não pode inferir-se qualquer resultado.**

É possível encontrar informações sobre as origens de erros e respetivas soluções em **“Guia para a resolução de problemas”**, página 37.

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



**Figura 13. Detecção dos padrões de quantificação (HI Virus-1 RG QS 1–4) no canal de fluorescência Cycling Green. NTC: nenhum controlo de modelo (controlo negativo).**



**Figura 14.** Detecção do controle interno (IC) no canal de fluorescência **Cycling Orange com amplificação simultânea dos** padrões de quantificação (HI Virus-1 RG QS 1–4). NTC: Nenhum controle de modelo (controle negativo).

**Tabela 9. Interpretação dos resultados quantitativos**

<b>Resultado</b>	<b>Interpretação</b>
ARN de VIH >72 IU/ml	O resultado está dentro do intervalo de teste determinado. A probabilidade de detecção do ARN de VIH é >95%. O resultado de teste positivo está assegurado estatisticamente.
ARN de VIH <72 IU/ml	O resultado está fora do intervalo de teste determinado. A reprodutibilidade do resultado positivo não está assegurada.
ARN de VIH negativo	Não foi detetado ARN de VIH.





## Guia para a resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para obter mais informações, consulte também a página de perguntas frequentes no nosso Centro de Suporte Técnico: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://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](http://www.qiagen.com)).

### Comentários e sugestões

---

#### **Ausência de sinal com controlos positivos (HI Virus-1 RG QS 1–4) no canal de fluorescência Cycling Green ou Cycling A.FAM**

- |   |  |
|---|--|
| a) O canal de fluorescência selecionado para análise dos dados de PCR não cumpre o protocolo  |  Para análise de dados, selecionar o canal de fluorescência Cycling Green ou Cycling A.FAM para a RT-PCR de VIH-1 analítica e o canal de fluorescência Cycling Orange ou Cycling A.ROX para a RT-PCR do controlo interno. |
| b) Programação incorreta do perfil de temperatura do instrumento Rotor-Gene   |  Comparar o perfil de temperatura com o protocolo. Ver <b>“Protocolo: PCR e análise de dados”</b> , página 27.  |
| c) Configuração incorreta da PCR  |  Rever os passos com ajuda do esquema de pipetagem e, se necessário, repetir a PCR. Ver <b>“Protocolo: PCR e análise de dados”</b> , página 27.   |
| d) As condições de armazenamento para um ou mais componentes do kit não cumprem as instruções fornecidas em <b>“Conservação”</b> (página 7) |  Verificar as condições de armazenamento e a data de validade (ver etiqueta do kit) dos reagentes e usar um novo kit, caso seja necessário.   |

## Comentários e sugestões

---

- e) O kit *artus* HI Virus-1 RG RT-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 no canal de fluorescência Cycling Orange ou Cycling A.ROX e ausência simultânea de sinal no canal Cycling Green ou Cycling A.FAM

- a) As condições da PCR não cumprem os requisitos do protocolo
- ⓘ Verificar as condições da PCR (ver acima) e repetir a PCR com as definições corrigidas, caso seja necessário.
- b) A PCR foi inibida
- ⓘ Certificar-se de que é utilizado o método de isolamento recomendado e seguir atentamente as instruções do fabricante.
- c) ARN 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 ARN durante a extração. Certificar-se de que é utilizado o método de isolamento recomendado (ver "**Isolamento de ARN**", página 24) e seguir atentamente as instruções do fabricante.
- d) As condições de armazenamento para um ou mais componentes do kit não cumprem as instruções fornecidas em "**Conservação**" (página 7)
- ⓘ Verificar as condições de armazenamento e a data de validade (ver etiqueta do kit) dos reagentes e usar um novo kit, caso seja necessário.
- e) O kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR expirou
- ⓘ Verificar as condições de armazenamento e a data de validade (ver etiqueta do kit) dos reagentes e usar um novo kit, caso seja necessário.

## Comentários e sugestões

---

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

- a) Contaminação ocorrida durante a preparação da PCR
- ① Repetir a PCR com novos reagentes nos replicados.
  - ① Se possível, fechar os tubos de PCR diretamente após adicionar a amostra a ser testada.
  - ① Certificar-se de que pipeta o controlo positivo sempre no fim.
  - ① Assegurar que o espaço de trabalho e os instrumentos são descontaminados regularmente.
- b) Contaminação ocorrida durante a extração
- ① Repetir a extração e a PCR da amostra a ser testada usando novos reagentes.
  - ① Assegurar que o espaço de trabalho e os instrumentos são descontaminados regularmente.

## Referências

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

Para obter uma lista completa de referências, visitar a base de dados de referências da QIAGEN online em [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) ou contactar a Assistência Técnica ou o distribuidor local da QIAGEN.

## Informações para encomenda

Produto	Índice	N.º de cat.
Kit <i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-PCR (24)	Para 24 reações: 2 masters, 4 padrões de quantificação, controlo interno, água (grau PCR)	4513263
Kit <i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-PCR (96)	Para 96 reações: 2 masters, 4 padrões de quantificação, controlo interno, água (grau PCR)	4513265
<b>Kit QIAamp DSP Virus — para purificação de ácidos nucleicos virais de plasma humano para fins de diagnóstico in vitro</b>		
QIAamp DSP Virus Kit	Para 50 preparações: Colunas para Centrifugação QIAamp MinElute®, Reagentes, Tubos, Extensores da Coluna e Conectores de Vácuo	60704
<b>Rotor-Gene Q MDx — para análise da PCR em tempo real validada por em aplicações clínicas</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Ciclador de PCR em tempo real com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Ciclador de PCR em tempo real com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9002033



<b>Produto</b>	<b>Índice</b>	<b>N.º de cat.</b>
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9002032
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Instrumento de PCR em tempo real com 6 canais (azul, verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), incluindo computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9002043
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Instrumento de PCR em tempo real com 6 canais (azul, verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), incluindo computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9002042
<b>Rotor-Gene Q — para um desempenho superior em PCR em tempo real</b>		
Rotor-Gene Q 5plex System	Ciclador de PCR em tempo real com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Ciclador de PCR em tempo real com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9001570

<b>Produto</b>	<b>Índice</b>	<b>N.º de cat.</b>
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9001650
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9001580
Rotor-Gene Q 6plex System	Instrumento de PCR em tempo real com 6 canais (azul, verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), incluindo computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Instrumento de PCR em tempo real com 6 canais (azul, verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), incluindo computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9001590
<b>Acessórios Rotor-Gene Q</b>		
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloco de alumínio para configuração da reação manual com pipeta de um canal em 72 tubos de 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Bloco de alumínio para configuração da reação manual numa variedade padrão de 8 x 12 utilizando 96 tubos de 0,2 ml	9018905

<b>Produto</b>	<b>Índice</b>	<b>N.º de cat.</b>
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 tiras de 4 tubos e tampas para 1000 reações	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos e tampas para 10 000 reações	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 tubos de parede fina para 1000 reações	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 tubos de parede fina para 1000 reações	981008

Para obter informações de licenciamento atualizadas e renúncia de responsabilidades específicas do produto, consultar o manual do utilizador ou o manual de instruções do kit QIAGEN respetivo. Os manuais do kit QIAGEN e do utilizador estão disponíveis em [www.qiagen.com](http://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

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

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

O kit artus HI Virus-1 RG RT-PCR e o kit QIAamp DSP Virus são kits de diagnóstico com a marca CE, de acordo com a diretiva europeia 98/79/CE para Diagnóstico In Vitro. Não disponível em todos os países.

#### **Acordo de licença limitada**

A utilização deste produto implica a concordância por parte de qualquer comprador ou utilizador do kit artus HI Virus-1 RG RT-PCR com os seguintes termos:

1. O kit artus HI Virus-1 RG RT-PCR só pode ser usado de acordo com o *Manual do kit artus HI Virus-1 RG RT-PCR* e apenas com os componentes contidos no kit. A QIAGEN não concede qualquer licença ao abrigo de sua propriedade intelectual para usar ou incorporar os componentes englobados neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, exceto conforme descrito no *Manual do kit artus HI Virus-1 RG RT-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, ver [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2015 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)

