

Janeiro de 2019

Manual do *artus*[®] HCV QS-RGQ Kit



Versão 2
Para uso com os instrumentos
QIASymphony[®] SP/AS e
Rotor-Gene[®] Q

IVD

CE₀₁₉₇

REF

4538366

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
ALEMANHA



R2 **MAT**

1115368 PTBR

Conteúdo

Uso previsto	5
Resumo e explicação	5
Informações do agente patogênico.....	6
Antecedentes	6
Definição da doença clínica.....	6
Estratégias terapêuticas atuais	7
Materiais fornecidos	9
Conteúdo do kit	9
Materiais necessários mas não fornecidos	10
Preparação das amostras	10
Adaptadores para o QIASymphony SP	10
Reagentes e materiais de consumo do QIASymphony SP.....	10
Adaptadores para o QIASymphony AS.....	11
Reagentes e materiais de consumo do QIASymphony AS	11
Equipamento.....	12
Controles de processo completos externos.....	12
Avisos e precauções	13
Avisos	13
Precauções gerais	14
Armazenamento e manuseio de reagentes	15
Procedimento.....	15
Coleta de amostras	15
Armazenamento e transporte de amostras.....	16
Preparação de amostras	17

Detecção de RNA específico do VHC.....	18
Procedimento	19
Preparação do RNA transportador e adição do controle interno às amostras	19
Ativação dos instrumentos QIA Symphony SP/AS.....	20
Purificação de RNA viral.....	21
Conjuntos de controle do ensaios e conjuntos de parâmetros do ensaio	21
Protocolo: Isolamento do RNA e configuração do ensaio no QIA Symphony SP/AS	22
Pontos importantes antes de iniciar.....	22
O que fazer antes de iniciar.....	23
Configuração do QIA Symphony SP	24
Procedimento usando o QIA Symphony SP/AS	25
Purificação de RNA viral no QIA Symphony SP.....	25
Configuração do QIA Symphony AS.....	27
Produtos consumíveis.....	27
Adaptadores e suportes de reagentes.....	28
Ponteiras com filtro.....	28
Carregamento das gavetas do QIA Symphony AS para configuração do ensaio.....	29
Protocolo: RT-PCR no instrumento Rotor-Gene Q	32
Pontos importantes antes de iniciar.....	32
Procedimento usando o instrumento Rotor-Gene Q	32
Configurações de análise	35
Critérios de validade de ensaios e amostras.....	35
Resultados de controle de processos completos.....	37
Quantificação	38

Interpretação dos resultados	39
Características de desempenho	40
Limite do branco e especificidade	40
Limite de detecção (Limit of Detection, LOD)	40
Limite de detecção dos genótipos 2 a 6 do vírus da hepatite C	42
Intervalo linear e limite de quantificação	43
Precisão, repetibilidade e variabilidade de lote para lote	45
Reprodutibilidade	47
Reatividade cruzada e infecções mistas	49
Substâncias interferentes	52
Contaminação cruzada	56
Desempenho clínico	57
Limitações	60
Controle de qualidade	60
Referências	61
Símbolos	62
Guia de solução de problemas	65
Informações para pedidos	72

Uso previsto

O ensaio *artus* HCV QS-RGQ é um teste de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro* baseado na tecnologia de reação em cadeia de polimerase de transcrição reversa (RT-PCR), para uso com os instrumentos QS-RGQ, para a detecção quantitativa de RNA do vírus da hepatite C (VHC) (genótipos 1-6) em plasma EDTA de indivíduos infectados pelo VHC.

O ensaio *artus* HCV QS-RGQ destina-se para uso em conjunto com a apresentação clínica e outros marcadores laboratoriais para o prognóstico da doença e como auxiliar na avaliação da resposta viral ao tratamento antiviral, conforme medido pelas alterações nos níveis de RNA do VHC no plasma humano com EDTA no início, durante o tratamento e no final do tratamento. O ensaio *artus* HCV QS-RGQ não é destinado a triagem sanguíneo, plasmática ou de soro para a infecção por VHC. O ensaio não deve ser usado como um teste diagnóstico para confirmar a presença de infecção pelo VHC.

Resumo e explicação

O *artus* HCV QS-RGQ Kit compõe um sistema pronto-para-uso para a detecção do RNA de VHC com o uso de PCR nos instrumentos Rotor-Gene Q, com a preparação da amostra e a configuração do ensaio usando os instrumentos QIASymphony SP/AS. O Vírus da Hepatite RG Master A e B contém reagentes e enzimas para a amplificação específica de uma região do par de bases 69 do genoma do VHC, e para a detecção direta do amplicon específico no canal de fluorescência Cycling Green do instrumento Rotor-Gene Q.

Além disso, o *artus* HCV QS-RGQ Kit contém um segundo sistema de amplificação heteróloga para identificar uma possível inibição da PCR. Isso é detectado como um controle interno (IC) no canal de fluorescência Cycling Orange do instrumento Rotor-Gene Q. O limite de detecção da PCR do VHC não é reduzido. São fornecidos controles externos positivos (Vírus da Hepatite C RG QS 1-4), que permitem a determinação da quantidade de RNA viral.

Informações do agente patogênico

Antecedentes

O VHC é um vírus RNA da família Flaviviridae. Cercado por uma estrutura de envelope e codificando apenas 10 proteínas maduras, o VHC é responsável por patologias graves que vão desde a inflamação do fígado (hepatite) e cirrose até o carcinoma hepatocelular (hepatocellular carcinoma, HCC), que é invariavelmente fatal. Existem mais de 200 milhões de transportadores de VHC em todo o mundo, quatro milhões deles na Europa. A infecção pelo VHC é uma das principais causas de doença hepática crônica em todo o mundo, sendo que a maioria das pessoas não sabe que tem a infecção. O VHC é classificado em seis genótipos principais (1–6) com o genótipo 1 (subtipos a e b) sendo o subtipo mais comum na América do Norte e Europa Ocidental (1). Há uma homologia de nucleotídeos de apenas 55% a 70% entre cada genótipo, e mais de 80 subtipos foram identificados. A determinação do genótipo é recomendada para o manejo clínico adequado e para prever a probabilidade de resposta ao tratamento (2).

Definição da doença clínica

A infecção aguda por VHC permanece, na grande maioria dos casos, completamente assintomática. O período de incubação do VHC varia entre 6 a 10 semanas e o início da doença pode ter sintomas inespecíficos, incluindo anorexia, desconforto abdominal vago, náuseas e vômitos, febre e fadiga. Em casos mais raros, estes sintomas iniciais podem incluir icterícia. Apenas uma pequena porcentagem (10–30%) dos indivíduos com infecção aguda eliminará o vírus. Na maioria dos casos, o VHC estabelece a infecção ao longo da vida e o paciente se torna um portador crônico.

A infecção crônica pelo VHC é definida como a continuação da doença sem melhora por um período de mais de 6 meses e se desenvolve em cerca de dois terços dos indivíduos infectados. Em 10 a 20%, a infecção crônica pelo VHC leva à cirrose e, posteriormente, à insuficiência hepática, com taxas de mortalidade de até 25%. Apenas 1 a 5% dos portadores

do VHC desenvolvem HCC e isso tende a ser raro em casos não cirróticos. É importante ressaltar que a infecção pelo VHC pode permanecer assintomática por até 20 anos antes do desenvolvimento de complicações graves.

Embora os mecanismos por trás da progressão da doença não sejam totalmente compreendidos, vários fatores têm sido relatados como influenciadores da taxa de progressão da doença por VHC. Isso inclui idade (aumento da idade associada a progressão mais rápida), sexo (os homens têm uma progressão mais rápida da doença), consumo de álcool (associado a um aumento da taxa de progressão da doença) e a presença de gordura nas células hepáticas. Além disso, a coinfeção com o vírus da hepatite B (VHB) e com o vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) tem sido bem documentada para aumentar bastante a taxa de progressão da doença (3).

Estratégias terapêuticas atuais

O objetivo do tratamento é erradicar o VHC em indivíduos cronicamente infectados, levando a uma resposta virológica sustentada (RVS), que se aproxima de uma cura. Uma RVS é definida como RNA do VHC indetectável por 12 semanas (RVS12) ou 24 semanas (RVS24) após o término do tratamento, conforme medido por um ensaio de RNA sensível (com um limite de detecção [limit of detection, LOD] de ≤ 15 IU/ml). Se isso for alcançado, a infecção por VHC é curada em mais de 99% dos pacientes. A RVS costuma ser associada à resolução da doença hepática em pacientes sem cirrose. Pacientes com cirrose permanecem em risco de complicações com risco de vida; no entanto, a fibrose hepática pode regredir e o risco de complicações, como insuficiência hepática e hipertensão portal, é reduzido.

Até 2011, a combinação de interferon peguilado alfa (pegylated interferon alpha, PegIFN- α) e ribavirina por 24 ou 48 semanas foi o tratamento aprovado para o VHC crônico. Com esta terapia, os pacientes infectados com o genótipo 1 do VHC apresentaram taxas de RVS de aproximadamente 40% na América do Norte e 50% na Europa Ocidental. Aproximadamente 75% a 85% das pessoas com genótipo 2 ou 3 tiveram uma RVS 6 meses

após o término do tratamento, enquanto que para os outros genótipos (4, 5 e 6) a proporção ficou entre 50% e 75% (2).

Em 2011, os inibidores da protease telaprevir (TEL) e boceprevir (BOC) foram autorizados para tratamento em infecções por genótipo 1 do VHC. Estes foram os primeiros antivirais de ação direta (AADs) ativos contra o VHC e tiveram como alvo a serina protease do VHC NS3-4A. TEL e BOC foram administrados em combinação com PegIFN-a e ribavirina. Os doentes sem tratamento prévio com genótipo 1 tratados com regimes terapêuticos triplos obtiveram taxas de RVS mais elevadas do que a terapia dupla com PegIFN-a e ribavirina em monoterapia (4).

Desde então AADs pan-genotípicos mais eficazes com menos efeitos colaterais foram autorizados na UE e nos EUA (entre outras regiões), para uso como parte de terapias de combinação para a infecção por VHC. No momento, as combinações livres de IFN estão disponíveis pela primeira vez, com ribavirina permanecendo para certas combinações de tratamento. Os perfis de efeitos colaterais das terapias de combinação tripla BOC e TEL e os custos por RVS significam que, de forma ideal, eles não deveriam mais ser usados em pacientes infectados com o genótipo 1 do VHC em países com alta renda. Deve-se notar que muitos países com renda média só receberam aprovação para o uso de TEL e BOC recentemente, mas esses tratamentos estão sendo gradualmente eliminados em países de alta renda em favor dos AADs de segunda geração (2).

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

artus HCV QS-RGQ Kit			(72)
Referência			4538366
Número de reações			72
Azul	Hepatitis C Virus Master A (Vírus da Hepatite C Master A)	MASTER	3 × 820 µL
Violeta	Hepatitis C Virus Master B (Vírus da Hepatite C Master B)	MASTER	3 × 200 µL
Vermelho	Hepatitis C Virus RG QS 1 (Vírus da Hepatite C RG QS 1) (10 ⁴ IU/µl)		200 µL
Vermelho	Hepatitis C Virus RG QS 2 (Vírus da Hepatite C RG QS 2) (10 ³ IU/µl)		200 µL
Vermelho	Hepatitis C Virus RG QS 3 (Vírus da Hepatite C RG QS 3) (10 ² IU/µl)		200 µL
Vermelho	Hepatitis C Virus RG QS 4 (Vírus da Hepatite C RG QS 4) (10 ¹ IU/µl)		200 µL
Verde	Hepatitis C Virus RG Internal Control (Controle interno do Vírus da Hepatite C RG)	IC	2 × 1000 µL
Branco	Water (PCR grade) (Água (grau de PCR))		1900 µL
	Handbook (Manual)		1

QS (quantification standard): padrões de quantificação

Os volumes de reagentes foram otimizados para lotes de 24 amostras, incluindo os padrões de quantificação (QS 1 a 4) e um controle sem modelo (no template control, NTC).

Um número menor ou maior de amostras pode participar do ensaio, mas haverá um uso abaixo do ideal da mistura master devido à necessidade de incluir um volume morto, necessário para o QIA Symphony SP/AS.

Materiais necessários mas não fornecidos

Antes do uso, certifique-se de que os instrumentos tenham sido verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante. Este kit requer o uso dos instrumentos QIASymphony SP/AS e Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* com software apropriado (consulte abaixo para obter detalhes).

Preparação das amostras

- QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (Ref.º 937055)

Adaptadores para o QIASymphony SP

- Rack de microtubos de eluição QS (Adaptador de resfriamento, EMT, v2, Qsym, Ref.º 9020730)
- Introdutor de tubo 3B (Introdutor, 2,0 ml v2, samplecarr. (24), Qsym, Ref.º 9242083)

Reagentes e materiais de consumo do QIASymphony SP

- Cartuchos de preparo de amostras, 8 poços (Ref.º 997002)
- Tampas de 8 hastes (Ref.º 997004)
- Ponteiras com filtro, 1500 µl (Ref.º 997024)
- Ponteiras com filtro, 200 µl (Ref.º 990332)
- Microtubos de eluição CL (Ref.º 19588)

* Caso aplicável, é possível usar o instrumento Rotor-Gene Q 5plex HRM com data de fabricação de janeiro de 2010 ou posterior como alternativa ao instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. A data de fabricação pode ser consultada pelo número de série na parte traseira do instrumento. O número de série está no formato "mmaannn", sendo que "mm" indica o mês de fabricação em dígitos, "aa" indica os últimos dois dígitos do ano de fabricação e "nnn" indica o identificador único do instrumento.

- Sacos de descarte de ponteiras (Ref.º 9013395)
- Microtubos 2,0 ml tipo H ou microtubos 2,0 ml tipo I (Sarstedt®, Ref.ºs 72.693 e 72.694, www.sarstedt.com), para uso com amostras e controles internos
- Tubos BD 14 ml, 17 x 100 mm, poliestireno, fundo redondo (Becton Dickinson, Ref.º 352051) para uso na preparação do controle interno.

Adaptadores para o QIASymphony AS

- Suporte de reagentes 1 QS (Adaptador de resfriamento, Suporte de reagentes 1, Qsym, Ref.º 9018090)
- Tubos em tiras RG 72 QS (Adaptador de resfriamento, Tubos em tiras RG 72, Qsym, Ref.º 9018092)

Reagentes e materiais de consumo do QIASymphony AS

- Tubos em tiras e tampas, 0,1 ml (Ref.º 981103)
- Tubos, cônicos, 2,0 ml, Qsym AS (Ref.º 997102) ou microtubos 2,0 ml tipo I (Sarstedt, Ref.º 72.694.005)
- Tubo, cônico, 5,0 ml, Qsym AS (Ref.º 997104) ou tubos de base chata de PP (Sarstedt, Ref.º 60.558.001)
- Frascos de reagentes, 30 ml, Qsym AS (Ref.º 997108)
- Microtubos de eluição CL (Ref.º 19588)
- Ponteiras com filtro, 1500 µl (Ref.º 997024)
- Ponteiras com filtro, 200 µl (Ref.º 990332)
- Ponteiras com filtro, 50 µl (Ref.º 997120)
- Sacos de descarte de ponteiras (Ref.º 9013395)

Equipamento

- Pipetas (ajustáveis)* e ponteiros de pipetas estéreis com filtros
- Agitador de vórtex*
- Centrífuga de bancada* com rotor para tubos de reação de 2 ml e capacidade de centrifugação a 6.800 x g.
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM*† (ref.º 9002032) e versões 2.3 ou superior do software do Rotor-Gene Q
- Instrumento QIAasymphony SP (ref.º 9001297)* e instrumento QIAasymphony AS (ref.º 9001301)* e versão 4.0.3 ou superior do software QIAasymphony

Controles de processo completos externos

Os controles de processo completos externos (full process controls, FPC) não são necessários para realizar o ensaio *artus* HCV QS-RGQ; no entanto, controles positivos e negativos devem ser rotineiramente testados em cada laboratório de acordo com as diretrizes ou requisitos de regulamentos locais, estaduais e/ou federais ou organizações de credenciamento.

Um controle de processo completo altamente positivo (high positive full process control, H-FPC) e um controle de processo completo pouco positivo (low positive full process control, L-FPC) destinam-se a monitorar todo o processo. Um controle de processo completo negativo (negative full process control, N-FPC) detecta contaminação do reagente ou ambiente pelo VHC.

Recomenda-se testar controles de processo negativos e positivos para o VHC em cada teste de PCR. Os controles do processo devem ser tratados como amostras e submetidos ao mesmo

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

† Caso aplicável, é possível usar o instrumento Rotor-Gene Q 5plex HRM com data de fabricação de janeiro de 2010 ou posterior. A data de fabricação pode ser consultada pelo número de série na parte traseira do instrumento.

O número de série está no formato "mmaannn", sendo que "mm" indica o mês de fabricação em dígitos, "aa" indica os últimos dois dígitos do ano de fabricação e "nnn" indica o identificador único do instrumento. † Associação Internacional de Transporte Aéreo (IATA). Regulamentos para mercadorias perigosas.

procedimento de isolamento de RNA. As amostras previamente caracterizadas podem ser usadas para este propósito.

Avisos e precauções

Para uso em diagnóstico in vitro.

Leia atentiosamente todas as instruções antes de usar o teste.

Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (safety data sheets, SDS). Essas fichas estão disponíveis on-line em formato PDF conveniente e compacto em **www.qiagen.com/safety**, onde você pode encontrar, visualizar e imprimir SDS para cada kit e componente de QIAGEN Kit.

Para obter informações de segurança sobre o kit de purificação usado, consulte o manual do kit relevante. Para obter informações de segurança sobre os instrumentos, consulte o manual do usuário do instrumento relevante.

Avisos

- Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre utilize um avental de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção.
- O uso deste produto restringe-se a pessoal especificamente instruído e treinado nas técnicas de RT-PCR e em procedimentos diagnósticos in vitro.
- As amostras sempre devem ser tratadas como infecciosas e/ou apresentando riscos biológicos de acordo com os procedimentos laboratoriais seguros.
- Use luvas protetoras descartáveis livres de pó, um avental de laboratório e proteção para os olhos ao manusear amostras ou os componentes do kit.

- Recomenda-se áreas de trabalho separadas e segregadas para preparação de amostras, montagem de reação e atividades de amplificação/detecção seguindo um conceito de 2 ambientes que separa a preparação da amostra e a montagem do ensaio da amplificação. O fluxo de trabalho no laboratório deve ocorrer de forma unidirecional. Use sempre luvas descartáveis em cada área e troque-as antes de acessar outra área.
- Dedique suprimentos e equipamentos às áreas separadas de trabalho e não os mova de uma área para outra.
- Evite a contaminação microbiana e de nuclease (DNase/RNase) das amostras e dos componentes do kit.
- Use sempre pontas de pipetas descartáveis e livres de DNase/RNase com barreiras de aerossol.
- Armazene material positivo e/ou potencialmente positivo separadamente de todos os outros componentes do kit.
- Não abra os tubos de reação após a amplificação para evitar a contaminação com amplicons.
- Não misturar componentes de kits com números de lote diferentes.
- Não use componentes do kit que ultrapassaram a data de validade.
- Descarte os resíduos da amostra e do ensaio de acordo com as regulamentações de segurança locais.

Precauções gerais

Observe sempre o seguinte:

- Durante as etapas manuais, os tubos devem permanecer fechados sempre que possível para evitar contaminação.
- Se todos os componentes foram descongelados por completo em temperatura ambiente (15 a 25 °C) antes do início do ensaio.

- Ao descongelar, misture os componentes chacoalhando repetidamente a pipeta ou no agitador de vórtex de pulso e centrifugue brevemente.
Nota: Se não há espuma ou bolhas nos tubos de reagentes.
- Garantir que os adaptadores necessários sejam resfriados previamente entre 2 e 8 °C.
- Trabalhe rapidamente e mantenha os reagentes da PCR em gelo ou no bloco de resfriamento antes do carregamento.
- Avançar de uma parte do fluxo de trabalho para a outra sem interrupções. O tempo de transferência entre cada módulo (QIAasymphony SP/AS para instrumento Rotor-Gene Q) não deve ultrapassar 30 minutos.

Armazenamento e manuseio de reagentes

Os componentes do *artus* HCV QS-RGQ Kit devem ser armazenados entre -15 e -30 °C. Master A e Master B podem ser reutilizados, mas não devem exceder um máximo de dois ciclos de degelo. Os volumes dos tubos foram otimizados para lotes de 24 reações.

Verificou-se que o QS 1-4 e o IC permanecem estáveis por até seis ciclos de congelamento/descongelamento.

Verificou-se que os reagentes são estáveis no QIAasymphony SP/AS durante a preparação da amostra ao testar o número máximo de amostras em um ensaio (ensaio com 3 transportadores).

Procedimento

Coleta de amostras

1. O sangue deve ser retirado em tubos de coleta de amostras padrão contendo EDTA.

2. O tubo deve ser misturado invertendo 8 vezes sem agitar a amostra antes da centrifugação para separar o plasma.

Importante: Amostras humanas heparinizadas não devem ser usadas, pois a heparina pode ser um agente interferente neste ensaio. Isso inclui amostras que foram coletadas em tubos contendo heparina, bem como amostras de pacientes que estão sendo tratados com heparina.

Armazenamento e transporte de amostras

Envie amostras no prazo de 24 horas após a coleta em um recipiente de transporte à prova de estilhaços a uma temperatura entre 2 e 8 °C, de acordo com as instruções legais para o transporte de material patogênico.*

A estabilidade das amostras de sangue total (antes da centrifugação) foi verificada para as seguintes condições de armazenamento:

- Temperatura ambiente (15-25°C) por até 24 horas

A estabilidade das amostras de plasma com EDTA (após centrifugação) foi verificada para as seguintes condições de armazenamento (incluindo o tempo necessário para o transporte):

- Temperatura ambiente (15-25°C) por até 24 horas
- 2–8°C por até 3 dias
- –15 a –30°C (ou mais frio) por até 6 semanas, incluindo até 3 ciclos de congelamento/descongelamento.

* Associação Internacional de Transporte Aéreo (IATA). Regulamentos para mercadorias perigosas.

Preparação de amostras

1. Coloque 1200 µl de plasma EDTA em um microtubo tipo H Sarstedt de 2,0 ml, sem base contornada (ref.º 72.693) ou microtubo Sarstedt de 2,0 ml tipo I, com base contornada (ref.º 72.694)
2. Coloque no QIAAsymphony SP/AS tomando cuidado para evitar gerar espuma.

Detecção de RNA específico do VHC

Tabela 1. Informações gerais do *artus* HCV QS-RGQ Kit

Kit	<i>artus</i> HCV QS-RGQ Kit (Ref.4538366)
Material de amostra	Plasma com EDTA
Purificação primária	QlAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (Ref.º 937055)
Volume da amostra (incluindo o volume excedente)	1200 µL
Conjunto de parâmetros do ensaio	170221_APS_HCV_v2_plasma1000_V2
Conjunto padrão de controle de teste	ACS_Cellfree1000_V7_DSP_artus_HCV_v2
Volume de eluição	90 µL
Volume de controle interno (internal control, IC) por amostra	9 µL
Versão do software QlAsymphony	Versão 4.0.3 ou superior
Volume da mistura Master	25 µL
Volume do modelo	25 µL
Número de reações	24–72* (incluindo todos os controles a serem carregados no QlAsymphony SP e QlAsymphony AS; isso corresponde a 19–67 amostras clínicas)
Tempo de execução no QlAsymphony SP/AS	Para 48 reações: aproximadamente 205 minutos
Tempo de execução do instrumento Rotor-Gene Q.	Aproximadamente 105 minutos

* Certifique-se de que o limite de 72 reações e 1 adaptador de rack de análise não seja excedido. Evite um tempo de incubação prolongado (> 30 minutos) entre a conclusão da montagem do ensaio e a transferência para o instrumento Rotor-Gene Q.

Procedimento

Preparação do RNA transportador e adição do controle interno às amostras

O uso do QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit em combinação com o *artus* HCV QS-RGQ Kit requer a introdução do controle interno (Vírus da Hepatite C RG IC) no procedimento de purificação para monitorar a eficiência da preparação da amostra e do ensaio a jusante.

O controle interno (internal control, IC) (Vírus da Hepatite C RG IC), fornecido com o *artus* HCV QS-RGQ Kit, deve ser adicionado à mistura de RNA transportador (CARRIER)–tampão AVE (AVE). O volume total da mistura de controle interno – RNA transportador (CARRIER)–tampão AVE (AVE) se mantém 120 µl por amostra.

Tabela 2 dá a mistura de reação do controle interno da amostra a uma razão de 0,1 µl por 1 µl de volume de eluição. É recomendável preparar misturas frescas para cada ensaio logo antes de sua utilização.

Tabela 2. Preparação do RNA transportador e controle interno (Controle interno do Vírus da Hepatite C RG)

Componente	Reações	
	Volume (µl) para n ≤13 em tubos Sarstedt*	Volume (µl) para n >13 em tubos Corning [†]
RNA transportador (CARRIER) concentrado	5	5
Controle interno (IC) (Controle interno do Vírus da Hepatite C RG)	9	9
Tampão AVE	106	106
Volume final por amostra (excluindo o volume morto)	120	120
Volume total para n amostras	(n × 120) + 360	(n × 120) + 600

* Microtubos 2,0 ml tipo H ou microtubos 2,0 ml tipo I (Sarstedt, Ref.^{os} 72.693 e 72.694). É necessária uma mistura de controle interno correspondente a 3 amostras adicionais (ou seja, 360 µl). Não ultrapasse o volume total de 1,92 ml (correspondente ao máximo de 13 amostras). Opcional para uso de mais de 13 reações, configure a mistura de controle interno em um tubo maior e carregue em múltiplos em microtubos de 2,0 ml. Certifique-se de que, para cada tubo, o volume excedente necessário de 3 reações adicionais seja adicionado.

† Se forem necessárias mais de 13 reações, prepare a mistura IC em um tubo maior (14 ml, 17 × 100 mm de fundo redondo de poliestireno, Corning, ref.^o 352051). É necessária uma mistura de CI correspondente a 5 amostras adicionais (ou seja, 600 µl). Não ultrapasse o volume total de 13,92 ml (correspondente ao máximo de 111 amostras).

Ativação dos instrumentos QIASymphony SP/AS

1. Feche todas as gavetas e as tampas.
2. Ligue os instrumentos QIASymphony SP/AS e espere aparecer a tela “Sample Preparation” (Preparo de amostras) e terminar o procedimento de inicialização.
3. Faça login no instrumento (as gavetas serão destravadas).

Purificação de RNA viral

O *artus* HCV QS-RGQ Kit foi validado com uma etapa de purificação de RNA viral, realizada no QIASymphony SP com o uso de um QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit. Consulte o Manual do *QIASymphony DSP Virus/Pathogen (QIASymphony DSP Virus/Pathogen Handbook)* para obter as informações sobre como preparar o cartucho de reagentes para a etapa de purificação de amostra no QIASymphony SP.

Conjuntos de controle do ensaios e conjuntos de parâmetros do ensaio

Os conjuntos de controle do ensaio são a combinação de um protocolo e de outros parâmetros, como o IC, para a purificação da amostra no QIASymphony SP. Para cada protocolo, há um conjunto de controle do ensaio padrão pré-instalado.

Os conjuntos de parâmetros do ensaio são a combinação de uma definição do ensaio e de outros parâmetros definidos, como a contagem de réplicas e o número de padrões do ensaio, para a sua configuração no QIASymphony AS.

Para ensaios integrados no QIASymphony SP/AS, o conjunto de parâmetros do ensaio é ligado diretamente a um conjunto de controle do ensaio prévio que especifica o procedimento de purificação de amostra correspondente.

Protocolo: Isolamento do RNA e configuração do ensaio no QIAasymphony SP/AS

Pontos importantes antes de iniciar

- Familiarize-se com o funcionamento dos instrumentos QIAasymphony SP/AS. Consulte os manuais do usuário fornecidos com o seu instrumento e certifique-se de que as versões sejam as especificadas no protocolo do estudo.
- Antes de usar um cartucho de reagentes (RC) pela primeira vez, verifique se os Tampões QSL2 e QSB1 no RC não contêm nenhum precipitado. Se necessário, remova os reservatórios que contêm os Tampões QSL2 e QSB1 do RC e incube-os durante 30 minutos a 37°C, agitando-os ocasionalmente para dissolver o precipitado. Recoloque os reservatórios nas posições corretas. Se o RC já estiver perfurado, vede os reservatórios com tiras de vedação reutilizáveis e incube o RC inteiro durante 30 minutos a 37 °C, agitando-o ocasionalmente em um banho-maria.*
- Tente evitar agitar vigorosamente o RC para não gerar espuma, o que poderia causar problemas de detecção do nível de líquido.
- Trabalhe rapidamente e mantenha os reagentes da PCR em gelo ou no bloco de resfriamento antes do carregamento.
- Os volumes de reagente são otimizados para 3 x 24 reações por kit. Mais ou menos amostras podem ser executadas, mas o uso abaixo do ideal do volume da mistura master disponível ocorrerá devido ao volume morto calculado necessário para o QIAasymphony.

* Certifique-se de que os instrumentos foram verificados, mantidos e calibrados regularmente de acordo com as instruções do fabricante.

- Antes de cada utilização, todos os reagentes precisam ser descongelados completamente, misturados (chacoalhando repetidamente a pipeta ou no agitador de vórtex de pulso) e centrifugados durante pelo menos 3 segundos a 6.800 x g. Evite a formação de espuma nos reagentes.
- Foi comprovado que os eluídos da preparação de amostras e todos os componentes do *artus* HCV QS-RGQ Kit são estáveis quando no instrumento pelo menos pelo tempo normal necessário para a purificação de 67 amostras e a configuração de 72 reações, incluindo até 30 minutos de tempo de transferência do QIAAsymphony SP para o QIAAsymphony SP/AS para o instrumento Rotor-Gene Q.

○ que fazer antes de iniciar

- Prepare todas as misturas necessárias. Se necessário, prepare as misturas que contenham RNA transportador (CARRIER) e os controles internos pouco antes de começar.
- Antes de iniciar o procedimento, verifique se todas as partículas magnéticas estão completamente ressuspensas. Agite em vórtex vigorosamente o reservatório que contém partículas magnéticas por, pelo menos, 3 minutos antes da primeira utilização.
- Antes de carregar o RC, remova a tampa do reservatório que contém as partículas magnéticas e abra os tubos de enzimas. Equilibre o rack de enzimas à temperatura ambiente 15 a 25 °C).
- Verifique se a tampa perfurante (piercing lid, PL) está inserida no RC e se a tampa do reservatório de partículas magnéticas foi removida ou, caso esteja utilizando um RC parcialmente usado, verifique se as tiras de vedação reutilizáveis foram removidas.
- Se as amostras tiverem código de barras, oriente-as no porta-tubos para uma posição em que os códigos de barras fiquem virados para o respectivo leitor na gaveta "Sample" (Amostra) à esquerda do QIAAsymphony SP.

Configuração do QIASymphony SP

Gaveta "Waste" (Resíduos)

Suporte de caixa unitária, 1–4	Caixas unitárias vazias
Suporte de saco de resíduos	Saco de resíduos
Suporte de recipiente de resíduos líquidos	Esvaziar e instalar o recipiente de resíduos líquidos

Gaveta "Eluate" (Eluído)

Rack de eluição	Usar o compartimento 1, posição de resfriamento
Volume de eluição*	Volume de eluição selecionado previamente: 60 µL Volume de eluição inicial: 90 µL

* O volume de eluição é selecionado previamente para o protocolo. Esse é o volume mínimo acessível de eluído no tubo de eluição final. O volume inicial da solução de eluição é necessário para garantir que o volume real de eluído seja igual ao volume selecionado previamente.

Gaveta "Reagents and Consumables" (Reagentes e materiais de consumo)

Posição 1 e 2 do cartucho de reagentes (RC)	Carregue 1 cartucho de reagentes (RC) para até 48 amostras ou 2 novos cartuchos de reagentes (RC) para até 67 amostras
Posições dos suportes de rack para ponteiras 1-4	Carregue racks suficientes com ponteiras com filtro descartáveis, 200 µl (consulte a peça de plástico necessária na tabela abaixo)
Posições dos suportes de rack para ponteiras 5-18	Carregue racks suficientes com ponteiras com filtro descartáveis, 1500 µl (consulte a peça de plástico necessária na tabela abaixo)
Posição do suporte de caixa unitária, 1-3	Carregue 3 caixas de unidades contendo cartuchos de preparação de amostras
Posição do suporte de caixa unitária 4	Carregue 1 caixa de unidade contendo 8 tampas cilíndricas da haste

Gaveta "Sample" (Amostra)

Tipo de amostra	Plasma com EDTA
Volume da amostra (incluindo o volume excedente)	1200 µL
Tubos de amostra	Microtubos 2,0 ml tipo H ou microtubos 2,0 ml tipo I (Sarstedt, Ref. ^{os} 72.693 e 72.694)
Introdutor	Introdutor do tubo 3B (Ref. ^o 9242083)

Peça de plástico necessária para 1-3 lotes de amostra

	Um lote, 24 amostras*	Dois lotes, 48 amostras*	Três lotes, 67 amostras*
Ponteiras com filtro descartáveis, 200 µl [†]	28	52	76
Ponteiras com filtro descartáveis, 1500 µl ^{††}	113	206	309
Cartuchos de preparo de amostra [§]	21	42	54
Tampas de 8 hastes [¶]	3	6	9

* O uso de mais de um tubo de controle interno por lote e a execução de mais de uma verificação de inventário exige ponteiras com filtro descartáveis adicionais.

† Há 32 ponteiras com filtro por rack para ponteiras.

‡ O número necessário de ponteiras com filtro inclui as ponteiras com filtro para 1 verificação de inventário por cartucho de reagentes.

§ Há 28 cartuchos de preparo de amostra por caixa unitária.

¶ Há doze tampas de 8 hastes por caixa unitária.

Procedimento usando o QIASymphony SP/AS

Purificação de RNA viral no QIASymphony SP

1. Feche todas as gavetas e as tampas do instrumento QIASymphony SP/AS.
2. Ligue o instrumento e espere aparecer a tela "Sample Preparation" (Preparo de amostras) e terminar o procedimento de inicialização.

O interruptor liga/desliga está localizado no canto inferior esquerdo do QIASymphony SP.

3. Faça logon no instrumento.
4. Prepare as seguintes gavetas de acordo com a seção "Configuração do QIASymphony SP", na página 24.
 - Gaveta "Waste" (Resíduos) e quando ela estiver pronta, realize uma verificação de inventário.
 - Gaveta "Eluate" (Eluídos) e quando ela estiver pronta, realize uma verificação de inventário.
 - Gaveta "Reagents and Consumables" (Reagentes e Consumíveis) e quando ela estiver pronta, realize uma verificação de inventário.
 - Gaveta "Sample" (Amostra)

5. Usando a configuração de "Integrated run" (Ensaio integrado) na tela sensível a toque do QIASymphony, insira as informações necessárias para cada lote de amostras a ser processado. Selecione um Conjunto de Parâmetros do Ensaio para o ensaio e atribua-o à configuração de ensaio do lote (assay set up, AS) correspondente às amostras.
6. As informações sobre o Conjunto de Parâmetros do Ensaio e o volume de eluição pré-selecionado são fornecidos na **Tabela 2**.

Para obter mais informações sobre realizar ensaios integrados usando o QIASymphony SP, consulte o manual do usuário do instrumento.

7. Ao configurar um ensaio integrado, verifique se a atribuição de equipamentos para manipulação de amostras, do tipo de amostra e dos volumes está correta.
As informações sobre os materiais de consumo e componentes que precisam ser carregados em cada gaveta são fornecidas na seção acima.
8. Após inserir as informações sobre todos os lotes do ensaio integrado, clique no botão "Ok" para sair da configuração de "Integrated run" (Ensaio Integrado). O status de todos os lotes na visão geral do ensaio integrado se altera de "LOADED" (Carregado) para "QUEUED" (Na fila de espera). Assim que um lote entra na fila de espera, o botão "Run" (Executar) é exibido, pressione-o para iniciar o procedimento.

Todos os passos de processamento são inteiramente automatizados.

Configuração do QIASymphony AS

Produtos consumíveis

Durante a configuração, as posições adequadas de cada material de consumo no módulo QIASymphony AS são indicadas na tela sensível ao toque no instrumento.

Produtos consumíveis	Nome na tela sensível ao toque	Para uso com adaptador/suporte de reagentes
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	QIA#981 103 Strip Tubes 0.1*	Tubos em tiras RG 72 QS
Tubos, cônicos, 2 ml, Qsym AS (500) ^{††}	QIA#997102 T2.0 Screw Skirt [§]	Suporte de reagentes 1 QS
Tubo, cônico, 5 ml, Qsym AS (500) ^{††}	QIA#997104 T5.0 Screw Skirt [§]	Suporte de reagentes 1 QS
Elution Microtubes CL (24 x 96)	QIA#19588 EMTR*	Rack de microtubos de eluição QS

* Indica o material de laboratório que pode ser resfriado com uso de um adaptador de resfriamento com código de barras.

† Para componentes da mistura master, mistura master preparada pelo sistema, padrões do ensaio e controles do ensaio.

‡ Como alternativa, podem ser usados os tubos Sarstedt descritos em “Materiais necessários mas não fornecidos”, na página 10.

§ O sufixo "(m)" na tela sensível ao toque indica que os cálculos de nível de líquido do tubo correspondente foram otimizados para reagentes que formam um menisco côncavo.

Adaptadores e suportes de reagentes

Rack/suporte de reagentes	Nome	Número necessário
Rack de amostras	Rack de microtubos de eluição QS	1
Suportes de reagentes	Suporte de reagentes 1 QS	1
Racks de ensaios	Tubos em tiras RG 72 QS	1

* O uso de mais de um tubo de controle interno por lote e a execução de mais de uma verificação de inventário exige ponteiras com filtro descartáveis adicionais.

Ponteiras com filtro

Carregue os racks para ponteiras com os compartimentos 1, 2 e 3 na gaveta "Eluate and Reagents" (Eluído e reagentes) e, em seguida, carregue os racks para ponteiras com os compartimentos 7, 8 e 9 na gaveta "Assays" (Ensaio).

Produtos consumíveis	Nome na tela sensível ao toque	Número mínimo para 24 reações	Número mínimo para 72 reações
Ponteiras com filtro, 1500 µl (1024)	1500 µL	5	6
Ponteiras com filtro, 200 µl (1024)	200 µL	10	10
Ponteiras com filtro, 50 µl (1024)	50 µL	25	73
Sacos para descarte de ponteiras	–	1	1

Carregamento das gavetas do QIASymphony AS para configuração do ensaio

1. Após colocar um ensaio integrado na fila de espera, abra as gavetas do QIASymphony AS. Os componentes necessários a serem carregados são exibidos na tela sensível a toque.
2. Lembre-se sempre de fazer o seguinte antes do ensaio integrado.
 - Insira o tubo de descarte de ponteiras
 - Jogue fora o saco de descarte de ponteiras
 - Instale um saco de descarte de ponteiras vazio
3. Defina e carregue o(s) rack(s) de ensaio. Os racks de ensaio nos adaptadores previamente resfriados são carregados nos compartimentos "Assay" (Ensaio). As informações sobre os racks de ensaios são fornecidas na seção anterior.
4. Verifique a temperatura das posições de resfriamento.

Quando as temperaturas de resfriamento desejadas forem atingidas, o pequeno asterisco ao lado de cada compartimento ficará verde.
5. Preencha cada tubo de reagente com o volume necessário do reagente apropriado, de acordo com as informações de carregamento fornecidas pelo software do instrumento.

Nota: Antes de cada utilização, todos os reagentes, exceto o Master Mix B, precisam ser descongelados completamente, misturados (chacoalhando repetidamente a pipeta ou no agitador de vórtex de pulso) e centrifugados durante pelo menos 3 segundos a 6.800 x g. Evite a formação de bolhas ou espuma, pois isso pode causar erros de detecção. Trabalhe rapidamente e mantenha os componentes da PCR em gelo ou no bloco de resfriamento antes do carregamento.

Nota: Reagentes viscosos podem ser difíceis de manipular com pipetas manuais. Certifique-se de transferir o volume pretendido do Master Mix para o tubo.

6. Recomenda-se digitalizar as informações do kit de análise para permitir a rastreabilidade ideal dos reagentes. Para tal, siga estes passos:
 - o Pressione o botão "Scan Kit Barcode" (Ler código de barras do kit): na tela sensível ao toque e pressione a linha de código de barras azul claro do kit.
 - o Pressione o campo de texto e, utilizando o leitor de código de barras portátil, digitalize o código de barras do kit na parte superior do *artus* HCV QS-RGQ Kit.
7. Carregue o suporte de reagentes e coloque os tubos, sem as tampas, nas posições adequadas dos adaptadores previamente resfriados dos reagentes.
8. Carregue os filtros descartáveis nas gavetas "Eluate and Reagents" (Eluído e reagentes) e "Assays" (Ensaio) de acordo com o número necessário de cada tipo de ponteira.
9. Feche as gavetas "Eluate and Reagents" (Eluído e reagentes) e "Assays" (Ensaio).
10. Após fechar cada gaveta, pressione "Scan" (Verificar) para iniciar a verificação de inventário de cada gaveta.

A verificação de inventário confere os compartimentos, adaptadores, filtros e o tubo de descarte de ponteiras, assim como o carregamento correto de volumes específicos de reagentes. Se necessário, corrija possíveis erros.

A configuração do ensaio iniciará automaticamente depois que a etapa de purificação no QIASymphony SP estiver concluída e os racks de eluídos forem transferidos para o QIASymphony AS.

11. Após o término do ensaio, pressione "Remove" (Remover) na tela "Overview" (Visão geral) da configuração do ensaio. Abra a gaveta "Assays" (Ensaio) e carregue o(s) rack(s) de ensaio.

Remova os reagentes residuais do *artus* HCV QS-RGQ do QIASymphony AS e descarte-os de acordo com os requisitos locais.

12. Baixe os arquivos de resultados e de ciclagem (opcional).

-
13. Transfira o arquivo de ciclagem do ensaio para o instrumento Rotor-Gene Q usando o QIASymphony Management Console (QMC) ou baixando em um pendrive.
 - Na interface do usuário de preparação de amostra, selecione a guia "In-/Output Files" (Arquivos de entrada/saída).
 - Insira o dispositivo USB, selecione 'Cycler files' (Arquivos de ciclagem) e transfira.
 - O aviso na tela deve confirmar a transferência, selecione ok e remova o dispositivo USB contendo os arquivos baixados.
 14. Prossiga para "Protocolo: RT-PCR no instrumento Rotor-Gene Q", na próxima página.
 15. Realize a manutenção de rotina do QIASymphony AS durante o ensaio de PCR no instrumento RotorGene Q ou posteriormente.

Como o fluxo de trabalho é uma operação integrada, limpe todos os instrumentos ao final do fluxo de trabalho concluído.

Siga as instruções de manutenção no "*QIASymphony SP/AS User Manual – General Description*". Certifique-se de que a manutenção seja realizada regularmente para minimizar o risco de contaminação cruzada.

Protocolo: RT-PCR no instrumento Rotor-Gene Q

Pontos importantes antes de iniciar

- Reserve um tempo para se familiarizar com o instrumento Rotor-Gene Q antes de iniciar o protocolo. Consulte o manual do usuário do equipamento.
- A montagem do ensaio requer que todos os quatro padrões de quantificação, assim como pelo menos um controle negativo (água de grau de PCR) sejam incluídos em cada ensaio de PCR.

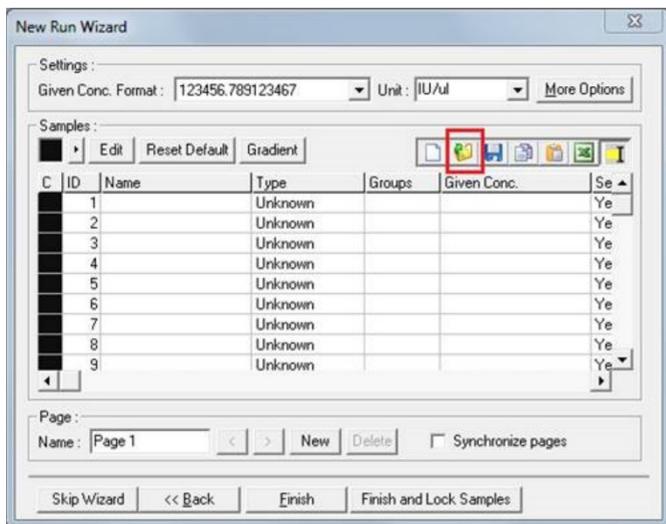
Procedimento usando o instrumento Rotor-Gene Q

1. Selecione o rotor de 72 poços na janela "New Run Wizard" (Novo assistente de execução).
2. Clique na caixa "Locking ring attached" (Anel de trava fixado) na página de configuração.
3. Clique no botão "Next" (Próximo) e confirme os parâmetros de execução.
4. Certifique-se de que a otimização de ganho esteja definida em QS1
5. Insira os dados de ID do operador e o volume da reação (50 µl)
6. Clique no botão "Start" (Iniciar) para iniciar a execução de PCR.
7. Nomeie as amostras

Nota: Recomenda-se que a lista de ID de amostra seja transferida eletronicamente do QIAasymphony SP/AS para o instrumento Rotor-Gene Q para evitar erros de entrada de dados.

8. Transfira o arquivo de ciclagem relevante para uma área local no computador

9. Selecione o ícone “Open file” (Abrir arquivo) (consulte a captura de tela no verso) no prompt de nomeação de amostra, em seguida, localize e abra o arquivo de ciclagem relevante.



10. Assim que as amostras forem nomeadas, clique em “Finish” (Encerrar).

11. Feche os tubos da PCR e coloque-os no Rotor de 72 poços do Rotor-Gene Q.

Certifique-se de que as tiras com 4 tubos do Rotor-Gene Q sejam transferidas na orientação correta para que os indicadores de posição do adaptador de resfriamento e do rotor coincidam.

Nota: Certifique-se de que o anel de travamento, acessório do instrumento Rotor-Gene Q, esteja posicionado sobre o rotor para evitar a abertura acidental dos tubos durante o ensaio.

12. Para a detecção do RNA do VHC, crie um perfil de temperatura como descrito em Tabela 3.

13. Certifique-se de que as configurações de otimização de ganho correspondam às especificadas em Tabela 4 e sejam aplicadas à posição do tubo contendo QS1 (este é o tubo após a última amostra de teste do QIA-symphony SP).

14. Inicie o ensaio.

Tabela 3. Parâmetros de execução do instrumento Rotor-Gene Q

Passo	Temperatura (°C)	Duração	Canais de aquisição	Número de ciclos
Passo de transcrição reversa (Reverse transcription, RT)	50	10 min	n/a	1
Desnaturação inicial/ativação enzimática	95	2 min	n/a	1
Desnaturação	95	10 s	n/a	45
Enrijecimento	55	20 s	n/a	
Elongação	72	20 s	Alvo: Verde Controle interno: Laranja	

Tabela 4. Configurações de otimização de ganho

Defina a temperatura em:	72°C				
Realize a otimização antes da primeira aquisição (verifique se ela está marcada)					
Configurações do canal de otimização de ganho automático					
Canal	Posição do tubo	Leitura mín.	Leitura máx.	Ganho mín.	Ganho máx.
Verde	QS1	5 FI	10 FI	-10	10
Laranja	QS1	5 FI	10 FI	-10	10

Configurações de análise

Esta seção descreve as configurações de análise no software Rotor-Gene Q (2.3. ou superior) após o término da execução. Usar as mesmas configurações de análise garante um desempenho de análise consistente e permite a comparação de resultados entre diferentes execuções.

Tabela 5. Parâmetros de análise de ensaio do artus HCV QS-RGQ Kit

Canal	Escala linear	Tubo dinâmico	Limiar	Ignorar o primeiro	Inclinação correta	Remoção de outliers (limiar de eficiência da reação)
Verde (FAM)	Selecionado	Selecionado	0.02	10	desligado	N/A
Laranja (Vermelho Texas)	Selecionado	Selecionado	0.02	15	desligado	N/A

N/A: não aplicável

Critérios de validade de ensaios e amostras

A interpretação dos resultados será realizada para todos os ensaios de PCR usando o software Rotor-Gene Q. A validade da execução e da amostra será avaliada conforme descrito em Tabela 6, Tabela 7, e Tabela 8 ao examinar a saída do instrumento Rotor-Gene Q. Apenas os resultados de amostra válidos de execuções válidas devem ser usados para a análise posterior.

Tabela 6. Critérios de validade de ensaio

Parâmetro de controle	Critério do canal Verde (FAM)	Critério do canal Laranja (Vermelho Texas)
Nenhum controle de template (No template control, NTC)	Sem amplificação	C _t 26.30–33.60
QS1	Amplificação	Amplificação*
QS2	Amplificação	Amplificação
QS3	Amplificação	Amplificação
QS4	Amplificação	Amplificação

* Em casos raros, uma carga viral muito alta do VHC pode causar falha no controle interno (IC). Se o IC de QS1 não amplificar, mas outros critérios de validade no ensaio forem atendidos, a execução deve ser tratada como válida.

Tabela 7. Critérios de validade de ensaio da curva padrão

Parâmetro de controle	Critérios
R ²	≥ 0.990
Intercepção ('B') C _t	30.75-34.43

A validade das amostras individuais são exibidas em Tabela 8 e são aplicáveis após a execução ter sido determinada como válida de acordo com os critérios Tabela 6 e Tabela 7.

Tabela 8. Critérios de validade das amostras

Amostra	Critério do canal Verde (FAM)	Critério do canal Laranja (Vermelho Texas)
VHC não detectado	Sem amplificação	≥ 25,00 C _t *
VHC detectado ≤ 2000 IU/ml	Amplificação	≥ 25,00 C _t *
VHC detectado > 2000 IU/ml	Amplificação	≥ 25,00 C _t †

* O delta entre o controle interno (IC) do controle sem modelo (NTC) e o controle interno (IC) da amostra deve ser < 3,50 C_t ($\Delta C_t IC = C_t IC_{Sample} - C_t IC_{NTC}$).

† Em casos raros, uma carga viral muito alta do VHC pode causar a falha do IC, mas se a concentração determinada do VHC estiver dentro do intervalo linear ($\leq 1 \times 10^8$ IU/ml) do ensaio, a amostra deve ser tratada como válida.

Resultados de controle de processos completos

Os controles de processo completos externos (FPC) são opcionais, porém recomendados. O ensaio *artus* HCV QS-RGQ não fornece regras fixas para a análise do FPC, uma vez que os FPCs são classificados como amostras e devem ser fornecidos e incluídos de acordo com os regulamentos locais, estaduais e federais.

Caso sejam incluídos, certifique-se de que:

- O alto FPC (H-FPC) reporta um resultado de amostra positivo de VHC dentro de especificações pré-definidas
- O baixo FPC (L-FPC) reporta um resultado de amostra positivo de VHC dentro de especificações pré-definidas
- O FPC negativo (N-FPC) reporta um resultado de amostra negativo de VHC

Se os resultados para H-FPC, L-FPC ou N-FPC estiverem fora das especificações pré-definidas pelo laboratório, siga os procedimentos padrão estabelecidos para uma análise de raiz do problema e avaliação apropriada da amostra e execute o status de validade.

Quantificação

Os padrões de quantificação (Vírus da Hep. C RG QS 1-4) no *artus* HCV QS-RGQ Kit são tratados como amostras previamente purificadas e utilizam um volume de amostra de 25 µl. Para gerar uma curva padrão nos instrumentos Rotor-Gene Q, os quatro padrões de quantificação devem ser utilizados e definidos na caixa de diálogo "Edit Samples" (Editar amostras) no instrumento Rotor-Gene Q como padrões com as concentrações especificadas (consulte o manual do usuário do instrumento para obter mais detalhes).

Nota: Os padrões de quantificação foram calibrados de acordo com o Padrão Internacional para VHC, conforme determinado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Os valores citados são indicados em IU/µl, devendo ser utilizada a seguinte equação para converter os valores obtidos da curva padrão de IU/µl para IU/ml, a fim de indicar a concentração de VHC na amostra.

$$\text{Resultado (IU/ml)} = \frac{\text{Resultado (IU/}\mu\text{l)} \times \text{volume de eluição inicial (90 }\mu\text{l)}}{\text{Volume de amostra (1 ml)}}$$

Interpretação dos resultados

O ensaio do *artus* HCV QS-RGQ Kit destina-se para uso em conjunto com a apresentação clínica do paciente e a determinação de outros marcadores laboratoriais. Este kit pode ser usado para determinar o prognóstico da doença e também como auxílio na avaliação da resposta viral ao tratamento antiviral, conforme medido pelas alterações dos níveis de RNA do VHC no plasma humano de EDTA no início, durante e no final do tratamento.

Tabela 9. Interpretação dos resultados do ensaio com o *artus* HCV QS-RGQ Kit

Sinal detectado no canal verde	Sinal detectado no canal laranja	Resultado quantitativo (IU/ml)	Interpretação
Sim	$\geq 25,00^*$	< 15	Resultado válido: RNA do VHC detectado, < 15 IU/ml, Não foi possível fazer a quantificação, pois o resultado quantitativo está abaixo do intervalo linear do ensaio.
Sim	$\geq 25,00^*$	≥ 15 e ≤ 2000	Resultado válido: RNA do VHC detectado na concentração calculada. O resultado quantitativo está dentro do intervalo linear do ensaio.
Sim	$\geq 25,00^\dagger$	> 2000 e $\leq 1 \times 10^8$	Resultado válido: RNA do VHC detectado na concentração calculada. O resultado quantitativo está dentro do intervalo linear do ensaio.
Sim	Sim/Não [†]	$> 1 \times 10^8$	Resultado válido: RNA do VHC detectado. Não foi possível fazer a quantificação, pois a quantificação está acima do intervalo linear do ensaio.
Não	$\geq 25,00^*$	0	Resultado válido: Nenhum RNA do VHC detectado.
Não	Não	-	Resultado inválido: Não foi possível concluir nenhum resultado.

* O delta entre o controle interno (IC) do controle sem modelo (NTC) e o IC da amostra deve ser $< 3,50 C_i$ ($\Delta C_{TIC} = C_i IC_{Sample} - C_i IC_{NTC}$).

† Em casos raros, uma carga viral muito alta do VHC pode causar falha no IC. Se a concentração determinada do VHC estiver dentro do intervalo linear do ensaio, a amostra deve ser tratada como válida.

Características de desempenho

Limite do branco e especificidade

O limite do branco (limit of blank, LOB) é definido como o resultado de medida mais alto que provavelmente será observado em uma amostra em branco. No caso do *artus* HCV QS-RGQ Kit, um parâmetro adequado para analisar o LOB é a intensidade de fluorescência do ponto final no canal de teste. Os níveis de fluorescência das amostras negativas devem permanecer abaixo de um determinado valor limite (por exemplo, 0,02) para gerar o resultado "RNA do VHC não detectado".

O desempenho do teste usando amostras negativas determina a probabilidade de possíveis resultados falso positivos.

Um total de 120 amostras de plasma EDTA seronegativas para o VHC de doadores individuais foi analisado utilizando o fluxo de trabalho *artus* HCV QS-RGQ. Nenhuma das 120 amostras gerou um valor de C_t antes do ciclo 45 e todas foram determinadas como "RNA de VHC não detectado". A especificidade do *artus* HCV QS-RGQ Kit para amostras seronegativas para VHC foi, portanto, de 100% com um LOB no ciclo 45 utilizando um limiar estabelecido em 0,02.

Limite de detecção (Limit of Detection, LOD)

O LOD do *artus* HCV QS-RGQ Kit foi determinado utilizando o 5º Padrão Internacional da OMS para VHC (código NIBSC 14/150) e seguiu a diretriz EP17-A2 (5) do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). O LOD foi definido como a menor quantidade de analito em uma amostra que é detectada com uma probabilidade de 95%. O 5º Padrão Internacional da OMS para o VHC foi utilizado para preparar um conjunto de seis diluições em série variando de 69,5 IU/ml em plasma EDTA. O LOB foi confirmado como sendo 0 IU/ml, conforme determinado por uma análise de amostras seronegativas de VHC.

Um total de 102 repetições por nível de concentração (101 repetições cada para 9 IU/ml e 15 IU/ml) foi testado em sete instrumentos QIA Symphony e sete instrumentos Rotor-Gene Q ao longo de três dias de estudo. Todas as réplicas de cada diluição foram testadas em um único ensaio de PCR. O teste foi realizado utilizando três lotes diferentes do *artus* HCV QS-RGQ Kit, sendo cada lote utilizado nos três dias diferentes por três operadores diferentes.

Uma regressão probit com o Software SAS® foi realizada e o valor de 95% de LOD foi determinado, bem como as taxas de acerto em 15 IU/ml. Os resultados são exibidos na Tabela 10 e na Tabela 11.

Tabela 10. Limite de estimativa de detecção por análise probit com limite de confiança de 95% nos dois lados

Estimativa do limite de detecção (LOD)	Limite inferior de confiança de 95% de dois lados	Limite superior de confiança de 95% de dois lados
10,66	8,90	14,21

Tabela 11. Resumo da taxa de acertos com um limite superior de confiança de 95%

Nominal IU/ml	Freq. acertos/nº total de reps	Taxa de acertos (%)	Taxa de acertos com limite superior de conf. de 95% de um lado (%)	Média calc. IU/ml	Média calc.log ₁₀ IU/ml	SD calc. log ₁₀ IU/ml	Tendência	FDD	TAE
5,40	84/102	82,35	88,27	7,87	0,90	0,243	0,16	4,86	0,65
9,00	91/101	90,10	94,53	12,30	1,09	0,312	0,14	7,64	0,76
15,00	99/101	98,02	99,65	19,31	1,29	0,295	0,11	6,85	0,70
25,00	102/102	100,00	100,00	36,67	1,56	0,191	0,17	3,48	0,55
41,70	102/102	100,00	100,00	56,55	1,75	0,187	0,13	3,39	0,51
69,50	102/102	100,00	100,00	103,64	2,02	0,178	0,17	3,18	0,53

Calc.: calculado; conf.: confiança; FDD (fold detectable difference): diferença detectável dobrada; Freq.: frequência; nº: número; reps.: réplicas; SD (standard deviation): desvio padrão; TAE (total analytical error): erro analítico total.

Limite de detecção dos genótipos 2 a 6 do vírus da hepatite C

A estratégia de verificação foi baseada nas orientações fornecidas na diretriz EP17-A2 (5) do CLSI. Para verificar o LOD e o limite inferior de quantificação (lower limit of quantification, LLOQ) a 15 IU/ml, cada genótipo de 2 a 6 do VHC foi testado com 60 réplicas a uma concentração de 15 IU/ml. As amostras clínicas representando cada genótipo foram diluídas para dar a concentração pretendida antes de serem testadas com o *artus* HCV QS-RGQ Kit. Este teste foi realizado com três lotes diferentes do *artus* HCV QS-RGQ Kit utilizando três sistemas diferentes de instrumentos QIA Symphony e Rotor-Gene Q. As taxas de acerto e o limite superior de confiança de 95% de um lado dos genótipos 2 a 6 do VHC em uma concentração nominal de 15 IU/ml são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12. Resumo da taxa de acertos dos genótipos 2 a 6 da hepatite C a 15 IU/ml, incluindo o limite superior de confiança de 95% de um lado.

Genótipo do vírus da hepatite C	Nominal IU/ml	Frequência de acertos/ nº total de reps	Proporção de acertos (%)	Limite superior de confiança de 95% de um lado
2	15	58/60	96,67	99,40
3	15	60/60	100,00	100,00
4	15	58/60	96,67	99,40
5	15	55/59	93,22	97,65
6	15	56/58	96,55	99,38

VHC: vírus da hepatite C.

Intervalo linear e limite de quantificação

O intervalo linear do *artus* HCV QS-RGQ Kit foi determinado seguindo as recomendações da Diretriz EP06-A (6) do CLSI. Isto envolveu a preparação de 10 diluições em série de construções de RNA de transcrição *in vitro* (in vitro transcription, IVT) incoadas, que foram representativas para os genótipos 1 a 6 do VHC. Cada construção foi diluída em série em plasma EDTA negativo para testar o intervalo de trabalho linear do ensaio. As concentrações testadas variaram entre 15 IU/ml e 1×10^8 IU/ml. As amostras foram analisadas utilizando o *artus* HCV QS-RGQ Kit e cada nível de diluição foi testado em seis réplicas. A figura 1 mostra a saída gráfica e o gráfico de regressão do genótipo 1 do VHC como exemplo, pois é o genótipo mais prevalente na população europeia.

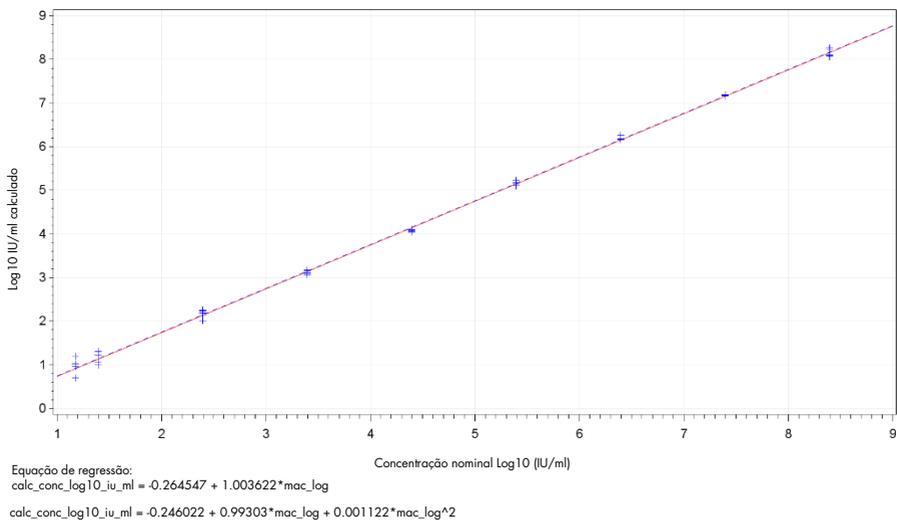


Figura 1. Log₁₀ IU/ml calculado vs log₁₀ IU/ml da concentração nominal do genótipo 1 do VHC. A linha sólida vermelha representa a linha de regressão linear e a linha tracejada em azul representa a linha de regressão quadrática.

O intervalo linear do *artus* HCV QS-RGQ V2 Kit foi determinado para abranger concentrações de 15 IU/ml a 1×10^8 IU/ml HCV em plasma EDTA dos genótipos 1-6. O LLOQ foi definido como a menor concentração dentro do intervalo linear que tem um erro analítico total (TAE; $2 \times$ desvio padrão [SD] + [Tendência]) de $\leq 1,0 \log_{10}$ IU/ml. Os dados gerados para a verificação do LOD no ensaio foram utilizados para calcular a diferença detectável dobrada [(fold detectable difference, FDD): $10^{((SD \text{ Total}) * \sqrt{2} * 2)}$] assim como o TAE a 15 IU/ml. Conforme exibido em Tabela 13, os genótipos 1 a 6 demonstraram um TAE de $\leq 1,0 \log_{10}$ IU/ml a 15 IU/ml.

Tabela 13. Taxa de acertos, concentração calculada do vírus da hepatite C (IU/ml), diferença detectável dobrada (fold detectable difference, FDD) e erro analítico total (total analytical error, TAE) a 15 IU/ml

Genótipo do VHC	Nominal IU/ml	Freq. acertos/nº total de reps	Média calc. IU/ml (Média geométrica)	Média calc. log ₁₀ IU/ml	SD calc. log ₁₀ IU/ml	Tendência	FDD	TAE
1 (OMS*)	15,00	99/101	19,31	1,29	0,295	0,11	6,85	0,70
2	15,00	58/60	21,00	1,32	0,258	0,15	5,37	0,66
3	15,00	60/60	10,77	1,03	0,403	-0,14	13,77	0,95
4	15,00	58/60	15,94	1,20	0,250	0,03	5,09	0,53
5	15,00	55/59	9,59	0,98	0,290	-0,19	6,61	0,77
6	15,00	56/58	17,10	1,23	0,273	0,06	5,94	0,60

* 5º Padrão Internacional da Organização Mundial da Saúde (OMS) para VHC (código NIBSC 14/150).

FDD: diferença detectável dobrada; Freq.: frequência; VHC: vírus da hepatite C; SD: desvio padrão; nº: número; reps.: réplicas; TAE: erro analítico total.

Precisão, repetibilidade e variabilidade de lote para lote

A precisão do *artus* HCV QS-RGQ Kit foi avaliada seguindo as recomendações da Diretriz EP05-A3 (7) do CLSI. Isso envolveu o teste de um painel com cinco membros, que incluiu uma amostra negativa, uma amostra com uma concentração de 3 x LOD, uma amostra clínica diluída 1:100 em plasma EDTA e duas amostras planejadas dentro do intervalo linear do ensaio. As amostras planejadas continham uma construção de RNA IVT incoado representante do genótipo 3 do VHC. Todas as amostras estavam em plasma EDTA. Um QS-RGQ integrado foi executado por cada operador ao longo de oito dias (não) consecutivos com quatro réplicas por membro do painel por execução. Isto significou que um total de 24 execuções (8 dias x 3 operadores x 1 execução por operador por dia) foram realizadas para este estudo, gerando 96 pontos de dados por membro do painel de teste em três lotes diferentes do *artus* HCV QS-RGQ Kit. Além disso, três plataformas QS-RGQ diferentes foram usadas para o teste, assim como três lotes diferentes de DSP Virus/Pathogen Midi Kit e três operadores diferentes realizando o teste.

Os componentes de variância deste estudo são exibidos em Tabela 14. O SD total foi reportado para Log₁₀ (IU/ml) e esta estimativa representa dentro da variabilidade laboratorial (ou seja, a precisão intermediária). Tabela 14 demonstra que o SD variou de 0,131 na concentração mais alta testada (5×10^6 IU/ml) a 0,222 na concentração mais baixa testada (45 IU/ml).

Tabela 14. Desvio padrão (SD) dos componentes de variância Log₁₀ calculado IU/ml e coeficiente de porcentagem log-normal da variância (% CV)

Conc. nominal IU/ml	Nº de observações	SD entre execuções (% CV)	SD entre dias (% CV)	SD entre operadores (% CV)	SD entre lote do kit (% CV)	SD entre lote de extração de ions (% CV)	SD dentro de execuções (% CV)	SD total (% CV total)
5×10^6	96	0,112 (26,30)	0,017 (3,82)	0,014 (3,34)	0,051 (11,86)	0,000 (0,00)	0,054 (12,38)	0,131 (30,96)
100	96	0,136 (32,04)	0,044 (10,21)	0,000 (0,00)	0,022 (5,05)	0,000 (0,00)	0,145 (34,22)	0,202 (49,14)
45	96	0,115 (26,86)	0,072 (16,60)	0,000 (0,00)	0,016 (3,68)	0,000 (0,00)	0,178 (42,86)	0,222 (54,62)
$18,9 \times 10^3$ (amostra clínica)	96	0,094 (21,97)	0,049 (11,24)	0,045 (10,46)	0,035 (7,96)	0,000 (0,00)	0,063 (14,69)	0,131 (30,74)

Conc.: concentração; CV: coeficiente de variância; SD: desvio padrão.

Um modelo foi ajustado aos dados com log₁₀ IU/ml como variável de resposta e lote do kit como efeito fixo categórico. A diferença na média log₁₀ IU/ml entre cada par de lotes de kit (ou seja, três diferenças no total) foi relatada juntamente com o erro padrão (standard error, SE) correspondente e intervalo de confiança de 95% (CI). Os resultados são exibidos na Tabela 15.

Tabela 15. Diferença na média calculada de log₁₀ IU/ml entre lotes de kit para cada execução de amostra

Conc. nominal IU/ml	Nº total de observações	Dif. entre os lotes do kit	Dif. de média log ₁₀ IU/ml	Erro padrão (SE)	Limite inferior de conf. de 95%	Limite superior de conf. de 95%	Valor p
5 × 10 ⁶	96	1-2	-0,046	0,030	-0,106	0,014	0,134
		1-3	-0,130	0,030	-0,190	-0,070	<0,001
		2-3	-0,085	0,030	-0,145	-0,025	0,006
100	96	1-2	-0,048	0,050	-0,146	0,050	0,336
		1-3	-0,117	0,050	-0,215	-0,018	0,021
		2-3	-0,069	0,050	-0,167	0,030	0,169
45	96	1-2	0,049	0,055	-0,060	0,159	0,371
		1-3	-0,058	0,055	-0,167	0,051	0,294
		2-3	-0,107	0,055	-0,217	0,002	0,054
18,9 × 10 ³ (amostra clínica)	96	1-2	-0,070	0,031	-0,132	-0,008	0,026
		1-3	-0,104	0,031	-0,166	-0,042	0,001
		2-3	-0,034	0,031	-0,096	0,028	0,278

Conc.: concentração; conf.: confiança; dif.: diferença.

A diferença máxima absoluta entre os diferentes lotes de kits utilizados foi 0,130 na média log₁₀ IU/ml.

Reprodutibilidade

O desenho deste estudo é baseado na diretriz EPO5-A3 (7) do CLSI. A precisão é definida como “a proximidade de concordância entre os valores medidos obtidos por medidas replicadas no mesmo objeto ou em objetos similares sob condições especificadas”. A reprodutibilidade, de acordo com a EPO5-A3, é a precisão plurilocal. Neste estudo, as condições laboratoriais foram variadas em dias, execuções (“dia” e “execuções” são confundidas) e o uso de três locais de teste diferentes (um local interno e dois locais de teste externos).

Em cada local de teste externo, foi realizada uma execução do *artus* HCV QS-RGQ Kit por dia durante um período de oito dias (não) consecutivos, com quatro réplicas por amostra por execução. Em cada um dos dois locais de teste externos, um único instrumento foi utilizado para um total de 16 execuções (8 dias x 1 corrida por dia x 2 locais de teste) neste estudo, além dos dados gerados internamente. O subconjunto dos dados gerados para o estudo de precisão e repetibilidade (consulte a página 45), onde os lotes do kit correspondem aos utilizados neste estudo, foi responsável pelo terceiro local de teste neste estudo de reprodutibilidade.

Tabela 16. Estatísticas resumidas do log₁₀ IU/ml calculado por concentração nominal da amostra para todos os três locais de teste

Conc. nominal IU/ml	Log10 IU/ml nominal	Nº de réplicas	Média	Mediana	Desvio padrão (SD)	Mínima	Máxima
5 x 10 ⁶	6,699	96	6,93	6,93	0,083	6,68	7,17
100	2,000	96	2,15	2,15	0,138	1,73	2,42
45	1,653	96	1,82	1,85	0,214	1,27	2,70
18,9 x 10 ³ (amostra clínica)	4,276	96	4,33	4,33	0,063	4,17	4,53

Conc.: concentração; Nº: número.

Conforme exibido em Tabela 16, o SD máximo nos três locais de teste foi de 0,214 log₁₀ IU/ml com a concentração mais baixa testada neste estudo, por exemplo, a 45 IU/ml (3 x LOD).

Reatividade cruzada e infecções mistas

Este estudo foi concebido para testar qualquer interferência na detecção do VHC devido a reatividade cruzada com patógenos relacionados ou similares ao VHC usando o *artus* HCV QS-RGQ Kit. Para amostras positivas para VHC, a ausência de interferência foi definida como nenhuma diferença significativa em \log_{10} IU/ml entre os resultados obtidos dos controles e das amostras com agentes patogênicos. Se qualquer diferença significativa fosse observada entre as amostras, ela deveria ser inferior ao dobro da precisão intermediária do ensaio. Além disso, amostras negativas para VHC tiveram um teste negativo para VHC quando testadas na presença de patógenos.

As amostras positivas para VHC foram fabricadas a uma concentração de 45 IU/ml utilizando material IVT não incorporado, representativo do genótipo 1a do VHC. Um total de 34 agentes patogênicos diferentes foi adicionado individualmente nas amostras positivas fabricadas do VHC, bem como em amostras negativas para VHC. Assim, o RNA foi extraído e testado em seis réplicas usando o instrumento QIA Symphony SP/AS e os instrumentos Rotor-Gene Q 5Plex HRM. Os controles utilizados para este estudo foram plasma negativo para o VHC sem patógenos (controle negativo) e plasma positivo para VHC sem agentes patogênicos, a uma concentração de 45 IU/ml (controle do VHC 45).

Os patógenos foram adicionados às amostras para criar uma concentração final de 1×10^5 em sua respectiva unidade, conforme indicado no certificado de análise (por exemplo, IU, cópias, partículas, dose infecciosa de cultura de tecidos que infectará 50% (tissue culture infectious dose, TCID₅₀), unidade de formação de colônias [colony forming units, CFU], partículas de vírus [virus particles, VP]). Os patógenos que não estavam suficientemente concentrados para criar essa concentração final na amostra foram preparados na maior concentração possível.

Tabela 17. Patógenos testados para reatividade cruzada contra amostras de controle negativas para o vírus da hepatite C e amostras positivas para o vírus da hepatite C a 45 IU/ml

Concentração final do teste	Espécies	VHC negativo	VHC 45 IU/ml				Valor p
		Freq. de chamadas negativas/nº total de amostras negativas	Diferença na média \log_{10} IU/ml	Erro padrão (SE)	Limite inferior de confi. de 95%	Limite superior de confi. de 95%	
1 x 10 ⁵ (IU/ml)	Adenovírus tipo 5	6/6	0,251	0,182	-0,123	0,626	0,179
Puro (sem estoque conc. dado)	Poliomavírus humano BK	6/6	0,022	0,182	-0,353	0,397	0,905
1 x 10 ⁵ CFU/ml	<i>Candida albicans</i>	6/6	0,148	0,182	-0,227	0,522	0,425
1 x 10 ⁵ IFU/ml	<i>Chlamydia trachomatis</i>	6/6	0,348	0,182	-0,026	0,723	0,067
1 x 10 ⁵ cópias/ml	Citomegalovírus	6/6	-0,079	0,161	-0,410	0,253	0,630
1 x 10 ⁵ cópias/ml	Vírus dengue 1	6/6	-0,170	0,160	-0,499	0,159	0,297
1 x 10 ⁵ cópias/ml	Vírus dengue 2	6/6	0,149	0,160	-0,180	0,478	0,361
1 x 10 ⁵ cópias/ml	Vírus dengue 3	6/6	-0,044	0,160	-0,373	0,285	0,786
1 x 10 ⁵ cópias/ml	Vírus dengue 4	6/6	0,126	0,160	-0,203	0,455	0,438
5 x 10 ³ TCID ₅₀ /ml	Vírus Epstein-Barr	6/6	-0,209	0,161	-0,540	0,122	0,205
1 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /ml	Vírus da Hepatite A	6/6	-0,275	0,161	-0,606	0,057	0,100
1 x 10 ⁵ CFU/ml	Vírus herpes simplex tipo 1	6/6	0,036	0,161	-0,295	0,367	0,823
1 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /ml	Vírus herpes simplex tipo 2	6/6	0,332	0,146	0,027	0,637	0,034
5 x 10 ³ TCID ₅₀ /ml	Vírus herpes humana tipo 8	6/6	0,265	0,146	-0,040	0,570	0,085
1 x 10 ⁵ PFU/ml -	Influenza A	6/6	0,152	0,139	-0,136	0,440	0,286
1 x 10 ⁵ CFU/frasco (/ml)	<i>Mycobacterium gordonae</i>	6/6	-0,143	0,139	-0,431	0,145	0,315
1 x 10 ⁴ CFU/frasco (/ml)	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	6/6	0,150	0,119	-0,095	0,395	0,220

		VHC negativo	VHC 45 IU/ml				
1 x 10 ⁴ CFU/frasco (/ml)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6/6	-0,173	0,119	-0,418	0,072	0,158
1 x 10 ⁵ CFU/frasco (/ml)	<i>Propionibacterium acnes</i>	6/6	0,042	0,119	-0,203	0,287	0,728
1 x 10 ⁵ CFU/frasco (/ml)	<i>Staphylococcus aureus</i>	6/6	0,133	0,119	-0,112	0,378	0,275
1 x 10 ⁵ CFU/frasco (/ml)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6/6	-0,156	0,186	-0,539	0,227	0,409
5 x 10 ³ TCID ₅₀ /ml	Vírus varicela-zoster (VZV)	6/6	-0,188	0,186	-0,571	0,195	0,321
1 x 10 ⁵ IU/ml	Vírus da Hepatite B	6/6	-0,138	0,186	-0,521	0,245	0,464
1 x 10 ⁵ IU/ml	HIV-1 IIB	6/6	0,042	0,186	-0,341	0,424	0,825
1 x 10 ⁵ CFU/ml	HIV-2 NIH-Z	6/6	0,097	0,158	-0,241	0,434	0,551
1 x 10 ⁵ células/ml	HPV16 Caski	6/6	0,270	0,146	-0,035	0,575	0,080
1 x 10 ⁵ células/ml	HPV18 HeLa	6/6	0,385	0,230	-0,093	0,864	0,109
1 x 10 ⁵ cp/ml	Vírus herpes humana tipo 6A GS	6/6	-0,436	0,170	-0,787	-0,085	0,017
1 x 10 ⁵ vp/ml	Vírus linfotrópico de células T humano tipo 1	6/6	-0,154	0,170	-0,504	0,197	0,376
1 x 10 ⁵ vp/ml	Vírus linfotrópico de células T humano tipo 2	6/6	0,209	0,230	-0,269	0,688	0,373
1 x 10 ⁵ U/ml-	Vírus da encefalite de St. Louis	6/6	0,148	0,164	-0,190	0,486	0,376
1 x 10 ⁵ CFU/ml	Vírus do Nilo Ocidental NY 2001-6263	6/6	-0,018	0,164	-0,356	0,320	0,913
1 x 10 ⁵ CFU/ml	Vírus da febre amarela 17-D	6/6	0,208	0,230	-0,270	0,687	0,375
8,13 x 10 ⁴ CFU/ml	Vírus zika MR 766	6/6	0,164	0,164	-0,174	0,501	0,328

Conforme exibido na Tabela 17, nenhum dos patógenos testados demonstrou reatividade cruzada com o *artus* HCV QS-RGQ Kit. Isto foi definido como nenhuma diferença significativa em \log_{10} IU/ml entre os resultados obtidos dos controles e das amostras de VHC 45 marcadas com patógeno. Nos casos em que foram observadas diferenças significativas, estas eram menores que $2 \times SD$ total do ensaio ($< 0,444 \log_{10}$ IU/ml, Tabela 17). Além disso, 100% das amostras negativas para VHC testadas na presença de patógenos geraram resultados negativos.

Substâncias interferentes

Os testes de interferência demonstraram o impacto de substâncias potencialmente interferentes que podem estar presentes no plasma humano EDTA no desempenho do ensaio do *artus* HCV QS-RGQ Kit. A diretriz EP7-A2 (8) da CSLI foi usada ao desenhar este estudo de teste de interferência. Neste estudo, substâncias potencialmente interferentes foram drogas usadas para o tratamento de infecções por VHC (por exemplo, substâncias exógenas, Tabela 18 e Tabela 19) assim como componentes sanguíneos e hormônios (por exemplo, substâncias endógenas, Tabela 20). Substâncias exógenas foram adicionadas na amostra em três vezes o nível plasmático máximo (C_{max}) daquela droga. As substâncias endógenas foram adicionadas nas concentrações dadas na diretriz EP7-A2 (8) CSLI. A interferência de substância foi testada em plasma humano EDTA negativo para VHC e em uma matriz de amostra negativa contaminada com VHC a 45 IU/ml ($3 \times LOD$) usando RNA IVT incoado, representativo do genótipo 1a do VHC.

Dez diferentes conjuntos de substâncias exógenas foram misturados nas duas diferentes concentrações experimentais (VHC negativo e VHC contaminado a 45 IU/ml). Os agrupamentos de substâncias exógenas foram baseados no tipo de solvente usado para ressuspensão (Tabela 18).

Tabela 18. Substâncias exógenas e seus agrupamentos gerados para testes

Grupo de substâncias exógenas/solvente usado para ressuspensão		Substâncias exógenas testadas
DMSO	1	Boceprevir, efavirenz, emtricitabina, raltegravir, zidovudina
	2	Aciclovir, atazanavir, darunavir, fosamprenavir, indinavir
	3	Azitromicina, elbasvir, pariteprevir, saquinavir, tenofovir
	4	Claritromicina, ganciclovir, lopinavir, telaprevir
Água livre de nuclease	5	Abacavir, ciprofloxacino, enfurvitide, telbivudina, valganciclovir
	6	Adefovir, fluoxetina, interferon alfa 2a, interferon alfa 2b, estavudina
	7	Daclatasvir, didanosina, lamivudina, ribavirina, sofosbuvir
Etanol	8	Entecavir, grazoprevir, ombitasvir, paroxetina, zalcitibina (DMSO)
	9	Amprenavir, nelfinavir, simeprevir, tipranavir
	10	Ledipasvir, ritonavir, sertralina, valaciclovir
DMSO	N/A	Nevirapina

DMSO: dimetilsulfóxido; N/A: não aplicável.

Tabela 19. Resumo das estatísticas das substâncias exógenas testadas

Diferença entre controle e substância interferente	Diferença na média calculada de log ₁₀ IU/ml	Erro padrão (SE)	Limite inferior de conf. de 95%	Limite superior de conf. de 95%	Valor p
Grupo 1 - CONTROLE	0,148	0,203	-0,272	0,567	0,474
Grupo 2 - CONTROLE	0,286	0,213	-0,154	0,726	0,193
Grupo 3 - CONTROLE	0,068	0,213	-0,372	0,509	0,751
Grupo 4 - CONTROLE	0,302	0,203	-0,118	0,722	0,150
Grupo 5 - CONTROLE	0,029	0,195	-0,375	0,432	0,884
Grupo 6 - CONTROLE	0,250	0,195	-0,153	0,654	0,212
Grupo 7 - CONTROLE	0,170	0,195	-0,234	0,573	0,393
Grupo 8 - CONTROLE	0,307	0,204	-0,114	0,728	0,145
Grupo 9 - CONTROLE	0,006	0,183	-0,380	0,391	0,976
Grupo 10 - CONTROLE	0,174	0,192	-0,228	0,577	0,375
Nevirapina - CONTROLE	0,014	0,183	-0,371	0,399	0,940

Conf.: confiança; SE: erro padrão.

Conforme exibido em Tabela 19, nenhuma das substâncias exógenas testadas neste estudo demonstrou uma diferença significativa em log₁₀ IU/ml quando comparada com as amostras controle (valor-p > 0,05). Além disso, não houve amplificação em amostras negativas para VHC quando essas amostras negativas foram contaminadas com uma substância exógena ou grupo de substâncias (dados não mostrados).

Tabela 20. Resumo das estatísticas das substâncias endógenas

Diferença entre controle e substância interferente	Diferença na média calculada de log ₁₀ IU/ml	Erro padrão (SE)	Limite inferior de conf. de 95%	Limite superior de conf. de 95%	Valor p
Triglicerídeos - CONTROLE	0,373	0,125	0,115	0,631	0,006
Bilirrubina conjugada - CONTROLE	0,277	0,119	0,033	0,521	0,028
Hemoglobina - CONTROLE	0,297	0,119	0,053	0,541	0,019
Bilirrubina não conjugada - CONTROLE	0,300	0,061	0,163	0,4370	<0,001
EDTA - CONTROLE	0,005	0,144	-0,321	0,331	0,973
Globulina - CONTROLE	0,256	0,058	0,124	0,387	0,002
hDNA - CONTROLE	0,066	0,079	-0,112	0,244	0,425
hRNA - CONTROLE	0,019	0,171	-0,368	0,405	0,915
Albumina - CONTROLE	-0,080	0,162	-0,442	0,281	0,631

Tabela 20 mostra que a bilirrubina conjugada e não conjugada, hemoglobina e globulina foram estatisticamente significativamente diferentes das amostras controle ($p = 0,028$, $p < 0,001$, $p = 0,019$ e $p = 0,002$, respectivamente), mas a diferença na média do log₁₀ IU/ml calculado foi 0,277, 0,300, 0,297 e 0,256, respectivamente. Isso significa que essas substâncias passaram os critérios de aceitação do estudo de $< 0,5$ log₁₀ IU/ml. Além disso, não houve amplificação em amostras negativas para VHC quando essas amostras negativas foram contaminadas com as substâncias endógenas (dados não mostrados).

Contaminação cruzada

O estudo de contaminação cruzada foi concebido para testar a contaminação cruzada entre as execuções integradas do QIASymphony SP/AS utilizando o fluxo de trabalho *artus* HCV QS-RGQ. A contaminação cruzada foi definida como a quantidade de analito transportada entre poços adjacentes durante os ensaios automatizados. O transporte de instrumentos, expresso em percentagem, foi calculado como:

$$\left(\frac{\text{Número de amostras negativas quando o alvo foi detectado}}{\text{Número total de amostras negativas}} \right) \times 100$$

Este estudo foi realizado utilizando amostras positivas para o VHC em concentrações clinicamente relevantes (1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7 IU/ml). Em diluições separadas, um RNA IVT incoado representando o genótipo 1a do VHC foi diluído em plasma EDTA para fornecer as diferentes concentrações. Cada uma dessas concentrações de amostra foi testada com amostras negativas para o VHC em uma ordem alternada para cinco ensaios consecutivos ("ensaios quadriculados"). Para cada concentração, um ensaio final (e sexto) foi realizado para determinar a contaminação entre os ensaios. A proporção de contaminação cruzada (transferência de instrumento como definida acima) foi calculada e o resultado para cada concentração é mostrado na Tabela 21 (abaixo).

Tabela 21. Taxa de contaminação cruzada em concentrações clinicamente relevantes

Concentração da amostra no formato quadriculado	Frequência da contaminação cruzada	Proporção da contaminação cruzada (%)
1×10^7 IU/ml	4/170	2,35
1×10^6 IU/ml	3/170	1,76
1×10^5 IU/ml	0/170	0,00

Desempenho clínico

O desempenho clínico do *artus* HCV QS-RGQ Kit foi avaliado durante um estudo comparativo em dois laboratórios clínicos no Reino Unido que testaram 452 amostras individuais, positivas ou negativas para o VHC. As amostras foram testadas utilizando o *artus* HCV QS-RGQ Kit em um laboratório clínico de rotina e as amostras refletiram as tendências epidemiológicas atuais do VHC na população de testes europeia. Amostras clínicas de determinados genótipos (4, 5 e 6) foram obtidas comercialmente para atingir a cobertura total dos genótipos atuais do VHC 1-6.

Neste estudo, as amostras dos pacientes foram testadas com o *artus* HCV QS-RGQ Kit e comparadas com resultados gerados previamente ou em paralelo de um ensaio comparativo com marcação CE. Uma análise de regressão de Deming e Pass-Bablok foi realizada com os resultados do teste do *artus* HCV QS-RGQ Kit no eixo y e o resultado do ensaio comparativo no eixo x. As estimativas dos parâmetros, juntamente com seus SEs e ICs de 95% correspondentes foram relatados. A análise de regressão foi realizada incluindo todas as amostras entre o LLOQ e o limite superior de quantificação (ULOQ) para ambos os ensaios (n = 165, Figura 2).

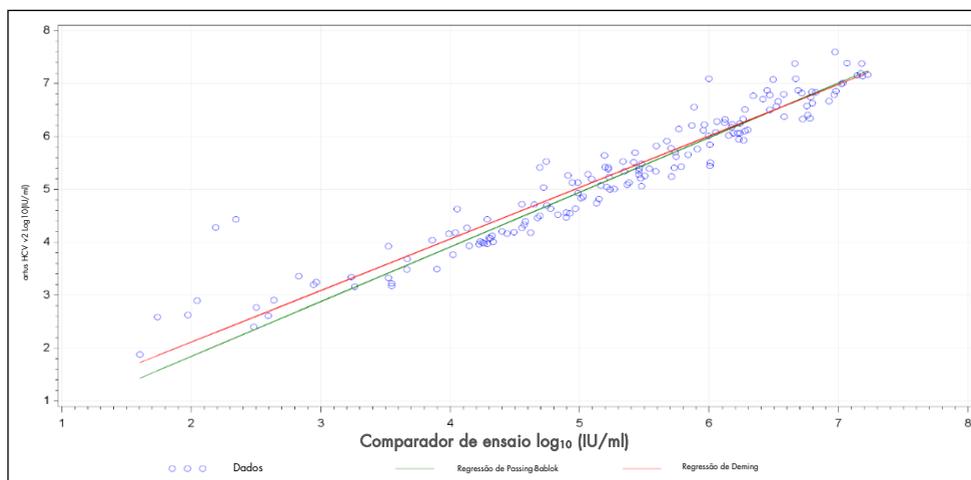


Figura 2: Gráfico de regressão com Linhas de Passing-Bablok e Deming (n=165).

Tabela 22. Análise de regressão para o *artus* HCV QS-RGQ Kit e um ensaio comparativo

Teste	Variável de resposta \log_{10} (IU/ml)	Variável de expl. \log_{10} (IU/ml)	Nº de observações	Intercepção	Intercepção do limite inferior de conf. de 95% de dois lados	Intercepção do limite superior de conf. de 95% de dois lados	Inclinação	Inclinação do limite inferior de conf. de 95% de dois lados	Inclinação do limite superior de conf. de 95% de dois lados
Deming	<i>artus</i> HCV QS-RGQ Kit	Comparador de ensaios	165	0,164	-0,190	0,519	0,974	0,912	1,036
Passing-Bablok	<i>artus</i> HCV QS-RGQ Kit	Comparador de ensaios	165	-0,222	-0,448	0,028	1,033	0,990	1,072

Conf.: confiança; Explic.: Explicativo; Nº: número.

Tabela 22 mostra que tanto para Deming quanto para Passing-Bablok, a intercepção é próxima de zero (0,164 e -0,222, respectivamente) e a inclinação é próxima de 1 (0,974 e 1,033, respectivamente). Isto demonstra uma estreita correlação global entre o *artus* HCV QS-RGQ Kit e o ensaio comparativo.

Limitações

- Para resultados de PCR ótimos, é necessário que as instruções do manual do usuário sejam rigorosamente observadas.
- Deve-se prestar atenção às datas de validade impressas na caixa e nas etiquetas dos componentes. Não utilizar componentes vencidos.
- Amostras fibrosas ou amostras que apresentam outros sinais de acúmulo de coágulos podem obstruir as ponteiros das pipetas e resultar em resultados falsos devido à transferência de volume insuficiente durante o processo de preparação da amostra.
- Embora rara, a ocorrência de mutações nas regiões altamente preservadas do genoma VHC cobertas pelos primers e/ou sonda do kit pode resultar em subquantificação da carga viral ou falha em detectar a presença de VHC nas amostras afetadas.
- O produto deve ser usado por usuários profissionais, como técnicos e médicos, com treinamento em procedimentos diagnósticos *in vitro*.

Controle de qualidade

De acordo com o Sistema de Gerenciamento de Qualidade da QIAGEN, certificado pelo ISO, cada lote do *artus* HCV QS-RGQ Kit é testado em relação a especificações predeterminadas para assegurar a consistência na qualidade do produto.

Referências

1. Polaris Observatory HCV Collaborators (2017) Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study; *Lancet Gastroenterol. Hepatol.*, **2**, 161.
2. European Association for Study of the Liver (2018). EASL recommendations on treatment of Hepatitis C 2018. *J. Hepatol.*, [Epub ahead of print].
3. European Association for Study of the Liver and Asociacion Latinoamericana para el Estudio del Hígado (2015). EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J. Hepatol.*, **63**, 237.
4. Harrington, P.R., Zeng, W., and Naeger, L.K. (2012) Clinical relevance of detectable but not quantifiable hepatitis C virus RNA during boceprevir or telaprevir treatment. *Hepatology* **55**, 1048.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP17-A2, Vol. 32 No. 8, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures, Approved Guideline – Second Edition 2012.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP06-A, Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline 2003.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP05-A3, Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline – Third Edition 2014.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP7-A2, Vol. 25 No. 27, Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Edition – Second Edition 2005.

Símbolos

Os símbolos na tabela a seguir são empregados nestas instruções de uso.

Símbolo	Definição do símbolo
 72	Contém reagentes suficientes para 72 testes
	Diagnóstico <i>in vitro</i>
	Marca CE
	Referência
	Número do lote
	Número do material

Símbolo	Definição do símbolo
	Componentes
	Contém
	Controle interno
	Número Global de Item Comercial (Global Trade Item Number)
Rn	R representa a revisão das Instruções de Uso (Manual) e n representa o número de revisão
	Limites de temperatura
	Fabricante

Símbolo

Definição do símbolo



Data de validade



Consulte as instruções de uso

Guia de solução de problemas

Consulte esta seção para casos de correção de erros de manuseio e resolução de problemas que surjam com o *artus* HCV QS-RGQ Kit. Se os passos recomendados não resolverem o problema, entre em contato com a Assistência Técnica da QIAGEN para suporte, pela nossa Central de Assistência Técnica em www.qiagen.com/support, pelo telefone 00800-22-44-6000, ou entrando em contato com um dos departamentos de assistência Técnica da QIAGEN ou com seus distribuidores locais.

Possível problema ou causa	Ação corretiva
Manuseio geral	
Mensagem de erro exibida na tela sensível ao toque	Se uma mensagem de erro for exibida durante a execução de um protocolo, consulte os manuais do usuário fornecidos com os instrumentos.
Precipitados no reservatório de reagentes do cartucho aberto do QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit	
a) Evaporação do tampão	A evaporação excessiva pode levar ao aumento da concentração de sal ou à diminuição das concentrações de álcool nos tampões. Descarte o cartucho de reagentes (RC). Vede os reservatórios do tampão de um cartucho de reagentes (RC) parcialmente usado com as tiras de vedação reutilizáveis quando não estiverem sendo utilizados para purificação.

Possível problema ou causa	Ação corretiva
b) Armazenamento do cartucho de reagentes (RC)	<p>O armazenamento do cartucho de reagentes (RC) em temperatura inferior a 15°C pode causar a formação de precipitados. Se necessário, remova os reservatórios que contêm os Tampões QSL2 e QSB1 do cartucho de reagentes (RC) e incube-os em banho-maria* a 37 °C durante 30 minutos, agitando-os ocasionalmente para dissolver o precipitado. Recoloque os reservatórios nas posições corretas. Se o cartucho de reagentes (RC) já estiver perfurado, feche os reservatórios novamente com tiras de vedação reutilizáveis e incube o cartucho de reagentes (RC) inteiro em um banho-maria durante 30 minutos a 37 °C, agitando-o ocasionalmente.</p>

Baixo rendimento de ácidos nucleicos

a) As partículas magnéticas não foram completamente ressusensas	<p>Antes de iniciar o procedimento, verifique se todas as partículas magnéticas estão completamente ressusensas. Agite em vórtex por, pelo menos, 3 minutos antes de usar.</p>
b) As amostras congeladas não foram misturadas corretamente após o descongelamento	<p>Descongele as amostras congeladas com uma leve agitação para garantir uma mistura homogênea</p>
c) RNA transportador (CARRIER) não adicionado	<p>Reconstitua o RNA transportador (CARRIER) em tampão AVE (AVE) e misture com o volume apropriado de tampão AVE (AVE), conforme descrito na seção apropriada acima Repita o procedimento de purificação com novas amostras.</p>

* Certifique-se de que os instrumentos foram verificados, mantidos e calibrados regularmente de acordo com as instruções do fabricante.

Possível problema ou causa	Ação corretiva
d) Ácidos nucleicos degradados	As amostras foram armazenadas incorretamente ou submetidas a muitos ciclos de congelamento e descongelamento. Repita o procedimento de purificação com novas amostras.
e) Lise incompleta da amostra	Antes de usar, verifique se o Tampão QSL2 e o QSB1 não contêm precipitados. Se necessário, remova os reservatórios que contêm os Tampões QSL1 e QSB1 do cartucho de reagentes (RC) e incube-os durante 30 minutos a 37 °C, agitando-os ocasionalmente para dissolver o precipitado. Se o cartucho de reagentes (RC) já estiver perfurado, feche os reservatórios novamente com tiras de vedação reutilizáveis e incube o cartucho de reagentes (RC) inteiro durante 30 minutos a 37 °C, agitando-o ocasionalmente em um banho-maria.
f) Obstrução da ponta da pipeta devido a material insolúvel	O material insolúvel não foi retirado da amostra antes do início do procedimento de purificação no QIASymphony. Para remover o material insolúvel para aplicações virais, centrifugue a amostra a 3.000 x g durante 1 minuto e transfira o sobrenadante para um novo tubo de amostra.

Possível problema ou causa

Ação corretiva

O QIASymphony AS detecta que o Master é insuficiente

Volume não necessário do Master foi transferido para o tubo

Combine o volume necessário de cada reagente em um tubo para ser colocado no Qiasymphony. Reagentes viscosos podem ser difíceis de manipular com pipetas manuais. Certifique-se de transferir todo o volume do Master no tubo. Para reagentes viscosos, recomenda-se aspirar um volume extra de 5% ao usar pipetas manuais (p. ex., ajuste a pipeta para 840 µl para um volume de 800 µl). Como alternativa, após dispensar o líquido lentamente e realizar o procedimento de sopro na parede do tubo de destino, remova a ponteira do líquido, solte o êmbolo da pipeta e aguarde mais 10 segundos. O líquido residual escorrerá pela ponteira e poderá ser soprado ao pressionar o êmbolo da pipeta uma segunda vez. O uso de filtros de grau PCR rotulados como de "baixa retenção" pode melhorar a recuperação do líquido.

Nenhum sinal de controles positivos (Vírus da Hepatite RG QS 1–4) no canal de fluorescência Cycling Green.

a) O canal de fluorescência selecionado para análise de dados de PCR não cumpre os requisitos do protocolo

Para a análise de dados, selecione o canal de fluorescência Cycling Green para a PCR analítica de VHC e o canal de fluorescência Cycling Orange para a PCR do controle interno.

b) Programação incorreta do perfil de temperatura do instrumento Rotor-Gene Q

Compare o perfil de temperatura com o protocolo. Veja as seções relevantes neste manual sobre os parâmetros de ciclagem do Rotor-Gene Q (consulte Tabela 3 e a seção "Configurações de análise", na página 35)

Possível problema ou causa	Ação corretiva
c) Configuração incorreta da PCR	Confirme se a configuração do ensaio foi feita corretamente e se foi usado o conjunto de parâmetros do ensaio correto (consulte Tabela 2). Se necessário, repita a PCR
d) As condições de armazenamento para um ou mais componentes do kit não cumprem as instruções fornecidas em "Armazenamento e manuseio de reagentes", na página 15)	Verifique as condições de armazenamento e a data de validade (consulte a etiqueta do kit) dos reagentes e use um novo kit, caso seja necessário.
e) O <i>artus</i> HCV QS-RGQ Kit está vencido	Verifique as condições de armazenamento e a data de validade (consulte a etiqueta do kit) dos reagentes e use um novo kit, caso seja necessário.

Sinal fraco ou inexistente do controle interno de uma amostra de plasma de VHC negativa ou pouco positiva submetida a purificação usando o QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit no canal de fluorescência Cycling Orange

a) As condições da PCR não cumprem os requisitos do protocolo	Verificar as condições da PCR (ver acima) e repetir a PCR com as configurações corrigidas, caso seja necessário.
b) A PCR foi inibida	Confirme se está sendo utilizado o método de isolamento validado (consulte "Protocolo: Isolamento do RNA e configuração do ensaio no QIASymphony SP/AS" na página 22) e siga atentamente as instruções.
c) RNA foi perdido durante a extração	A ausência de um sinal do controle interno pode indicar a perda de RNA durante a extração. Confirme se está sendo utilizado o método de isolamento validado (consulte "Protocolo: Isolamento do RNA e configuração do ensaio no QIASymphony SP/AS" na página 22) e siga atentamente as instruções. Consulte "Baixo rendimento de ácidos nucleicos" acima.

Possível problema ou causa	Ação corretiva
d) As condições de armazenamento para um ou mais componentes do kit não cumprem as instruções fornecidas em “Armazenamento e manuseio de reagentes” na página15)	Verifique as condições de armazenamento (consulte a etiqueta do kit) dos reagentes e use um novo kit, caso seja necessário.
e) O <i>artus</i> HCV QS-RGQ Kit está vencido	Verifique as condições de armazenamento e a data de validade (consulte a etiqueta do kit) dos reagentes e use um novo kit, caso seja necessário.

Possível problema ou causa**Ação corretiva**

Sinais com os controles negativos no canal de fluorescência Cycling Green da PCR analítica

a) Contaminação ocorrida durante a preparação da PCR

A evaporação excessiva pode levar ao aumento da concentração de sal ou à diminuição das concentrações de álcool nos tampões. Descarte o cartucho de reagentes (RC). Vede os reservatórios do tampão de um cartucho de reagentes (RC) parcialmente usado com as tiras de vedação reutilizáveis quando não estiverem sendo utilizados para purificação.

b) Contaminação ocorrida durante a extração

Repita a extração e a PCR da amostra a ser testada usando novos reagentes. Certifique-se de que o local de trabalho e os equipamentos são descontaminados regularmente.

Informações para pedidos

Produto	Conteúdo	Ref.^o
<i>artus</i> HCV QS-RGQ Kit	Para 72 reações: Master A e B, controle interno, padrões de quantificação do vírus da hepatite C 1–4, (vírus da hepatite C RG QS 1–4) e água de grau de PCR	4538366
Produtos relacionados		
QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (96)	Inclui 2 cartuchos de reagentes e racks de enzimas e acessórios	937055
QIASymphony SP	Módulo de preparo de amostra QIASymphony SP, 1 ano de garantia em peças e mão de obra	9001297
QIASymphony AS	Módulo de preparo de ensaio QIASymphony, 1 ano de garantia em peças e mão de obra	9001301
Rotor-Gene Q Software, versões 2.3 ou superior	Software para testes de rotina em combinação com os instrumentos Rotor-Gene Q e QIASymphony RGQ	9023241
Rotor-Gene Q MDx Cycler	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting (high resolution melt, HRM) com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim) mais canal HRM, computador laptop, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e treinamento não incluídos	9002032

T Marcas registradas: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, *artus*®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Group); Corning® (Corning Inc.); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.); SAS® (SAS Institute Inc.).

Histórico de revisão do documento	
R2 01/2019	Valor R ² atualizado na tabela 7 de $\geq 0,980$ a $\geq 0,990$. Dados faltantes de desempenho foram adicionados na tabela 15 Figura 2 e Tabela 22 foram atualizadas com dados novos

Contrato de Licença Limitada do *artus* HCV QS-RGQ Kit

O uso desse produto implica a concordância por parte de qualquer comprador ou usuário do produto com os seguintes termos:

- O produto pode ser usado somente de acordo com os protocolos fornecidos com o produto e esse manual e para uso com componentes contidos apenas no kit. A QIAGEN não concede qualquer licença sob sua propriedade intelectual para o uso ou incorporação dos componentes incluídos neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, exceto conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, este manual e quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com. Alguns desses protocolos adicionais foram fornecidos pelos usuários da QIAGEN para os usuários da QIAGEN. Esses protocolos não foram testados por completo nem otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não garante nem fornece garantias de que eles não infringem os direitos de terceiros.
- Com exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este kit e/ou a sua(s) utilização(ões) não infrinja os direitos de terceiros.
- Esse kit e seus componentes são licenciados para uso único e podem não ser reutilizáveis, reconstruídos nem revendidos.
- A QIAGEN especificamente renuncia a quaisquer outras licenças, indicadas ou embutidas, a não ser àquelas expressamente indicadas.
- O comprador e o usuário do kit concordam em não realizar nenhuma etapa, nem permitir que outra pessoa assim o faça, que possa levar ou facilitar quaisquer atos proibidos conforme descrito acima. A QIAGEN poderá executar as proibições desse Acordo de licença limitado em qualquer Tribunal. Também deverá recuperar todos os custos da investigação e relativos ao Tribunal, incluindo os encargos dos advogados, em qualquer ação para executar o Acordo de licença limitado ou quaisquer direitos de propriedade intelectual relacionados ao kit e/ou seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, veja www.qiagen.com.

A aquisição deste produto permite ao comprador 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 aquisição.

HB-2556-002 1115368 01/2019

© 2019 QIAGEN, todos os direitos reservados.

Encomendas: www.qiagen.com/contact | Suporte técnico: support.qiagen.com | Website: www.qiagen.com