



Pneumo CLART bacteria®

DETEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS
CAUSADORAS DE INFEÇÕES RESPIRATÓRIAS EM HUMANOS, PARA
O DIAGNÓSTICO *IN VITRO*

Pneumo CLART bacteria®

O conteúdo deste dispositivo encontra-se submetido a Patente Internacional WO2015055768.

CLART®, CLART-Strip®, CAR®, SAICLART® e Pneumo CLART bacteria® são Marcas registadas da GENOMICA.

Para mais informações, queira consultar o sítio WEB www.genomica.com



GENOMICA, S.A.U.

Parque Empresarial Alvento, Edificio B
Calle Vía de los Poblados, 1 – 1ª planta
28033 Madrid, Espanha

www.genomica.com



Versão 4

Julho 2015

ÍNDICE

1. GLOSSÁRIO
2. DESCRIÇÃO DO PROTOCOLO
3. COMPONENTES E ARMAZENAMENTO DO ESTOJO
 - 3.1. Reagentes de amplificação
 - 3.2. Reagentes de visualização
 - 3.3. Outros componentes
4. MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS
 - 4.1. Reagentes e materiais
 - 4.2. Equipamento
5. RECOMENDAÇÕES E PROCEDIMENTOS DE MANIPULAÇÃO
 - 5.1. Recomendações gerais
 - 5.2. Precauções a ter com a extração e adição de material extraído ao tubo de amplificação
 - 5.3. Precauções a tomar na amplificação
 - 5.4. Precauções a tomar na visualização
6. AMOSTRAS
7. PROTOCOLO DE TRABALHO
 - 7.1. Extração automática do ADN na NucliSENS™ EasyMag da Biomerieux
 - 7.2. Reação de amplificação
 - 7.3. Visualização do produto amplificado no CLART-Strip® (CS)
8. LEITURA DOS RESULTADOS
9. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
10. ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS E OPERACIONAIS
 - 10.1. Controlo de interferências conhecidas
 - 10.2. Especificações técnicas
11. BIBLIOGRAFIA

1. GLOSSÁRIO



Atenção, consulte as instruções de utilização.



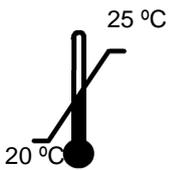
Data de validade.



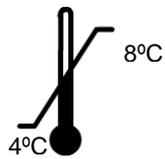
Dispositivo médico para o diagnóstico *In vitro*.



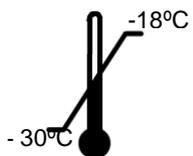
Lote



Guardar à temperatura ambiente.



Guardar a temperaturas entre 4° C e 8° C



Guardar a temperaturas entre – 30° C e – 18° C

2. DESCRIÇÃO DO PROTOCOLO

A *Pneumo CLART bacteria*[®] deteta a presença da bactéria principal causadora das infeções respiratórias em humanos nas seguintes amostras clínicas: cuspito, lavagens nasofaríngeas / exsudadas / aspiradas, lavagem bronco-alveolar e sucção brônquica.

As bactérias detetadas estão indicadas a seguir:

- *Staphylococcus aureus*^{1,2}
- *Streptococcus pneumoniae*²
- *Haemophilus influenzae*²
- *Haemophilus spp*²
- *Moraxella catarrhalis*²
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Bordetella pertussis*
- *Bordetella parapertusis*
- *Bordetella bronchiseptica*
- *Bordetella holmesii*
- *Bordetella spp.*³

A deteção é efetuada pela **amplificação** específica de cada micro-organismo na amostra, originando um fragmento variável entre **150 e 550 pares de bases**.

A fim de evitar resultados de falsos negativos, cada mistura inicial da RCP inclui os seguintes controlos:

- **Controlo interno da amplificação.** A sua deteção garante a prestação adequada do processo de amplificação.
- **Controlo genómico do ADN.** A deteção deste fragmento confirma o isolamento de material genético durante a etapa de extração.

A deteção do produto amplificado pela RCP é efetuada por intermédio de uma plataforma micro matriz de baixa densidade: CLART[®] (Clinical Arrays Technology – *Tecnologia de Matriz Clínica*). A plataforma baseia-se num princípio muito simples, mas, ao mesmo tempo, custo-eficaz. Consiste numa micro matriz impressa no fundo do alvéolo da placa de microtitulação (CLARTStrip[®] – CS) (figura 1), que simplifica a totalidade do processo de hibridização e visualização, quando comparado com sistemas clássicos de micro matrizes.



Figura 1. Plataforma CLARTStrip[®] – CS na forma de uma tira de 8 alvéolos

¹ Incluindo a deteção do transposão responsável pelo aparecimento da resistência à meticilina, *mecA*. A presença do *mecA* pode ser devida, não só, à deteção de *S. aureus*, mas, também, de quaisquer outros estafilococos coagulase negativos (ECN) presentes na amostra. O estojó deteta, apenas, o *mecA* positivo na presença de *S. aureus*.

² Estes micro-organismos podem estar presentes na flora comensal do paciente numa base regular, por isso, qualquer resultado positivo obtido em relação a essas bactérias, deverá ser avaliado, tendo em conta as circunstâncias, anteriormente, mencionadas.

³ O resultado positivo da *bordetella spp* será referenciado, no caso do software não dispuser de informação suficiente para diferenciar o subtipo e deteção de quaisquer das espécies de *bordetella* acima mencionadas.

O sistema de detecção da *Pneumo CLART bacteria*[®] baseia-se na precipitação de um produto insolúvel naquelas áreas de micro matrizes em que tem lugar a hibridização de produtos de amplificação com sondas específicas. Durante a RCP os produtos amplificados são etiquetados com biotina. Após a amplificação, estes produtos são hibridizados com as respetivas sondas complementares específicas que estão imobilizadas em áreas específicas e bem conhecidas de micro matrizes. Em seguida, são incubados com um conjugado de peroxidase de estreptavidina. O conjugado fica ligado, através da estreptavidina, à biotina presente nos produtos amplificados (que estão agregados às respetivas sondas específicas) e a atividade de peroxidase implica o aparecimento de um produto não solúvel, na presença do substrato de o-dianisidina, que se precipita nas áreas de micro matrizes, onde ocorre a hibridização (figura 2).

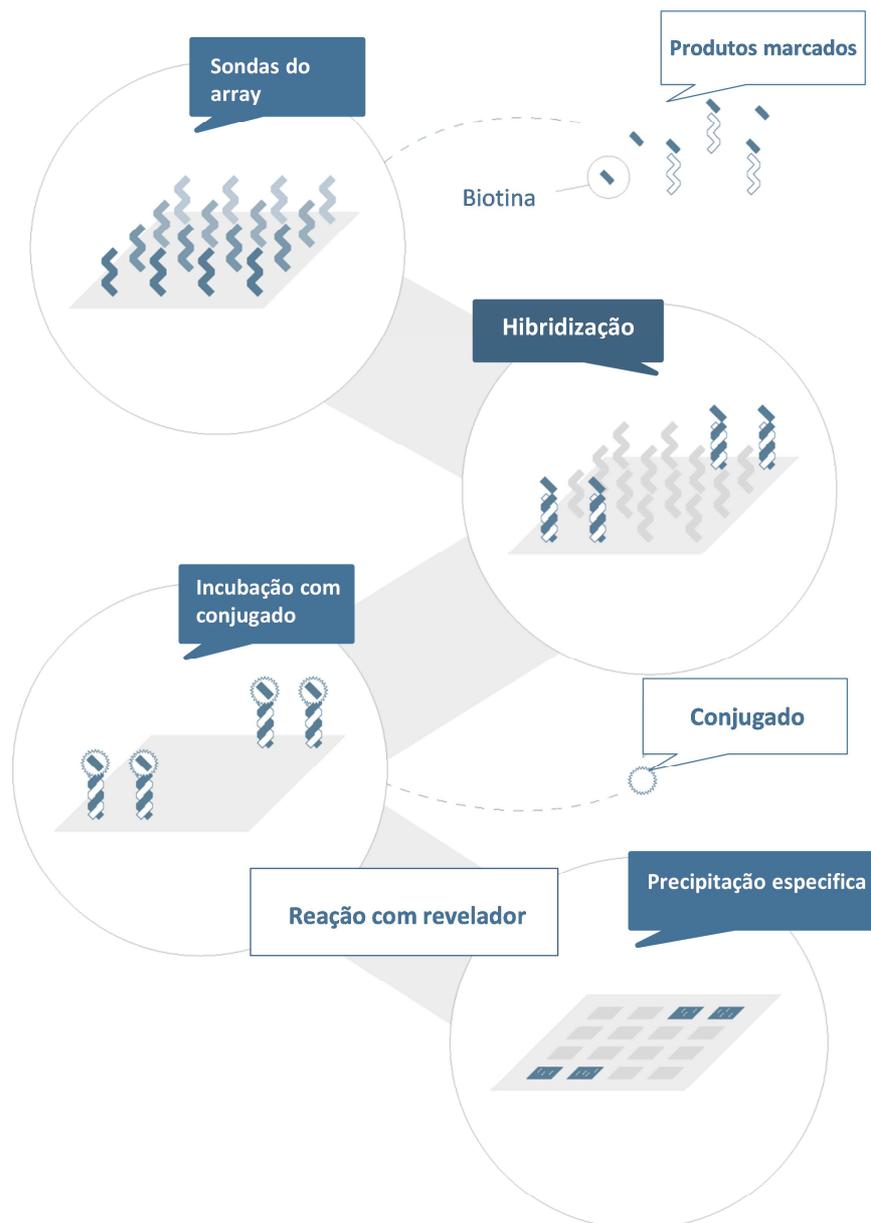


Figura 2: Diagrama do método de visualização. As sondas, imobilizadas na superfície, capturam os respetivos produtos complementares amplificados e etiquetados da biotina. Com a ajuda da biotina, colam-se ao conjugado, neste caso à estreptavidina-HRP (Horse Radish Peroxidase - "peroxidase de rábano"). O substrato de O-dianisidina, por ação da HRP, produz um precipitado na zona onde ocorre a hibridização.

3. COMPONENTES E ARMAZENAMENTO DO ESTOJO

O estojo da *Pneumo CLART bacteria*[®] contém reagentes em quantidade suficiente para executar 16 ou 48 análises de amostras clínicas. Os reagentes contidos no estojo foram agrupados em diversas embalagens, dependendo da respetiva temperatura de armazenamento. Se forem observadas as recomendações de armazenamento, todos os reagentes deverão permanecer estáveis até ao fim do prazo de validade do estojo.

3.1. REAGENTES DE AMPLIFICAÇÃO

Os reagentes são expedidos e devem ser guardados a – 20º C.

- **PK** (Proteinase K 10 x). Uma vez descongelado deve ser preservado em gelo e guardado a 4º C. Uma vez descongelado, o PK deve ser utilizado no prazo de um mês.
- **Tubos de amplificação** (tubo branco). Pronto a usar. Contém 45 µl de mistura reativa. Descongele sobre o gelo a quantidade exata de tubos de amplificação que vão ser utilizados e mantenha os restantes a – 20º C.

A fim de garantir a integridade dos reagentes e a cadeia de frio do produto, a embalagem do estojo inclui um indicador de temperatura autoadesivo e irreversível; o aparecimento de uma cor avermelhada na janela de visualização indica que, em dado momento, os produtos excederam a temperatura de armazenamento de – 20º C e não devem ser utilizados.

3.2. REAGENTES DE VISUALIZAÇÃO

O estojo de visualização é expedido e deve ser guardado a 4º C.

AVISO: Uma vez recebidas, as tiras (CS) CLART[®] devem ser guardadas à temperatura ambiente.

- **Tiras CS** (incluindo todas as sondas específicas). São fornecidas num envelope térmico selado. **Guarde-o à temperatura ambiente (máx. 25º C), protegido da luz direta.**
- **SH** (Solução de Hibridização). **Guarde à temperatura de 4º C.**
- **DC** (Diluyente do Conjugado). **Guarde à temperatura de 4º C.**
- **CJ** (Conjugado). **Guarde à temperatura de 4º C.** Centrifugue, uma vez, antes de utilizar.
- **RE** (Solução de Desenvolvimento). **Guarde à temperatura de 4º C e proteja da luz.**
- **TL** (Tampão de Lavagem). **Guarde à temperatura de 4º C.**
- **Adaptador e tampa para as tiras de 8 alvéolos:**

3.3. OUTROS COMPONENTES

Para efeitos de captura e posterior processamento da imagem, é necessário uma unidade de leitura, um software produzido à medida e uma placa adaptadora:

- **CAR[®]** (CLINICAL ARRAY READER – “Leitor da Matriz Clínica”): Permite a leitura e interpretação automática até 12 CS, i. é, até um máximo de 96 amostras.
- **SAICLART[®]**: software desenvolvido e validado pela GENOMICA para processamento de imagens.
- **Software** específico do dispositivo *Pneumo CLART bacteria*[®] concebido e validado pela GENOMICA



Figura 3: CAR® (CLINICAL ARRAY READER)

4. MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

A seguir apresenta-se uma lista de todos os materiais necessários mas que não são fornecidos.

4.1. REAGENTES E MATERIAIS

- Água destilada.
- Luvas descartáveis.
- Bicos de filtros ou pipetas de deslocamento positivo.
- Recipiente de gelo picado.
- Tubos de 1,5 ml do tipo Eppendorf para autoclave.
- Grade para tubos de 1,5 ml.
- Suporte para tubos de 0,5 ml / 0,2 ml.
- Solução salina NaCl a 0,9%.

4.2. EQUIPAMENTO

- Micro centrifugador.
- Aparelho de ciclagem térmica.
- Câmara laminar de fluxo para o laboratório de extração.
- Três micropipetas ajustáveis variando de 1 – 20 μ l, 20 – 200 μ l e 200 – 1000 μ l, para o laboratório de extração.
- Uma micropipeta ajustável variando de 1 – 20 μ l, para adicionar o material genético aos tubos de amplificação.
- Três micropipetas ajustáveis variando de 1 – 20 μ l, 20 – 200 μ l e 200 – 1000 μ l, para o laboratório de visualização.
- Bloco térmico com adaptador de placa, tampa e agitação ajustável a 25° C, 30° C e 56° C. compatível com placas de 96 alvéolos.

- Vórtice.
- Sistema de vácuo.

5. RECOMENDAÇÕES E PROCEDIMENTOS DE MANIPULAÇÃO

Leia, atentamente, antes de iniciar o ensaio, a fim de evitar a contaminação! Leia, atentamente, antes de iniciar a técnica.

5.1. RECOMENDAÇÕES GERAIS

1. **Este ensaio deve ser executado em duas zonas fisicamente separadas**, a fim de evitar a contaminação da amostra com o produto, previamente, amplificado. Devem estar disponíveis, separadamente, materiais de trabalho, em cada zona (pipetas, bicos, tubos, grelhas, luvas, etc.) e que nunca devem ser utilizados fora dessas mesmas zonas.
 1. **Zona pré-RCP:** A extração do ADN, preparação de amostras e adição do material extraído aos tubos de amplificação são efetuados nesta zona. A manipulação das amostras deve ser efetuada dentro de um gabinete de biossegurança (GBS).
 2. **Zona pós-RCP:** A amplificação e visualização do produto amplificado são efetuados nesta zona. O material desta zona nunca deve entrar em contacto com o material da zona de extração. Evite entrar na zona de pré-RCP depois de ter trabalhado na zona de visualização.
2. **Utilize, sempre, luvas.** Veja a secção 5.2.

Recomenda-se que as luvas sejam substituídas com frequência e é obrigatório substituir as luvas antes de iniciar os trabalhos em cada uma das zonas anteriormente citadas. Devem ser, sempre, utilizadas luvas novas quando se adiciona o ADN aos tubos de amplificação.
3. **Limpe as zonas de trabalho** (prateleiras dos laboratórios, capotas, grelhas, pipetas), rigorosamente, com uma solução diluída de lixívia a 10% **depois de cada processamento de amostras em lote**; é obrigatório desinfetar todas as zonas de trabalho no caso de contaminação. Recomenda-se, com referência aos aparelhos de ciclagem térmicas e misturadores térmicos, que os mesmos sejam limpos antes e depois do uso, nestas mesmas condições.
4. Utilize, sempre, bicos de filtro e pipetas de deslocamento positivo a fim de evitar a contaminação devido às micropipetas. Devem ser usadas, em cada zona, diferentes conjuntos de pipetas.
5. Deite fora o bico da micropipeta depois de utilizar a mesma.
6. Utilize material laboratorial descartável e esterilizável em autoclave.
7. Nunca misture reagentes de dois frascos diferentes, ainda que os mesmos pertençam ao mesmo lote.
8. Encerre os tubos de reagentes, imediatamente depois de os utilizar, a fim de evitar qualquer contaminação.
9. A GENOMICA não é responsável pelos resultados obtidos com o estojo se forem usadas outras amostras, diferentes das indicadas.

5.2. PRECAUÇÕES A TER COM A EXTRAÇÃO E ADIÇÃO DE MATERIAL EXTRAÍDO AO TUBO DE AMPLIFICAÇÃO

Visto que a maior parte das deteções da *Pneumo CLART bacteria*[®] estão presentes na superfície da pele, é, por isso, muito importante evitar a contaminação com estes micro-organismos. Para se proceder em conformidade, devem ser seguidas as seguintes precauções:

- Utilize um gel desinfetante ou etanol a 70% para a limpeza das mãos e a pele dos antebraços.

Cubra as mesmas com luvas de Manga comprida.

- Minimize o contacto com a superfície externa das luvas, ao calçá-las.
- Evite tocar na pele e no cabelo, enquanto estiver a manusear as amostras. Se tocar nas mesmas, troque de luvas.
- Limpe as superfícies de trabalho das estantes com uma solução diluída de lixívia a 10%.
- Ligue o fluxo laminar e a lâmpada de UV, pelo menos, 20 minutos antes da extração. Desligue a lâmpada de UV quando a mesma estiver a trabalhar dentro do armário.
- A preparação das amostras antes da extração deve ser efetuada dentro do armário.

5.3. PRECAUÇÕES A TOMAR NA AMPLIFICAÇÃO

- Coloque os tubos de amplificação no aparelho de ciclagem térmica quando o bloco estiver acima de 90º C, minimizando, assim, eventuais amplificações não específicas devido à incubação abaixo da temperatura de hibridação.

5.4. PRECAUÇÕES A TOMAR NA VISUALIZAÇÃO

1. Evite que o bico da pipeta ou o sistema de aspiração toque no fundo do alvéolo, uma vez que isto pode danificar as sondas impressas no fundo do alvéolo.
2. Recomenda-se que todas as soluções sejam adicionadas junto à parede do alvéolo CS e nunca, diretamente, no fundo.
3. É conveniente que não se adicione a solução SH (solução de hibridização) até que os produtos desnaturados de RCP estejam prontos.
4. A matriz não pode permanecer seca.
5. No seguimento da incubação com a solução CJ, é muito importante lavar, rigorosamente, a micro matriz, de modo a evitar quaisquer resíduos que possam reagir com a solução RE, podendo, daqui, resultar uma precipitação não específica que poderá levar a falsas interpretações do resultado.
6. Evite a formação de espuma quando estiver a adicionar qualquer reagente.
7. Quando se estiver a visualizar a imagem no leitor, certifique-se que os marcadores de posição aparecem e que não existem borbulhas, fibras ou manchas que interfiram com a leitura. Caso contrário, limpe a face exterior do alvéolo com papel celulósico.

6. AMOSTRAS

O estojo da *Pneumo CLART bacteria*[®] foi concebido e validado para ser utilizado com o ADN extraído das amostras respiratórias: cuspito, lavagens nasofaríngeas / exsudadas / aspiradas, lavagem bronco-alveolar e sucção brônquica. A GENOMICA não é responsável pelos resultados obtidos se outros tipos de amostras, diferentes das indicadas, forem usadas.

Guarde as amostras a 4º C se estas forem processadas num prazo inferior a 12 horas. Caso contrário, devem ser guardadas congeladas a – 20º C.

7. PROTOCOLO DE TRABALHO

7.1. EXTRAÇÃO AUTOMÁTICA DO ADN NA NucliSENS™ EasyMag DA BIOMERIEUX

- Por cada série de amostras a serem analisadas, deve ser incluído um controlo de extração negativo (cloreto de sódio a 0,9%), a fim de confirmar que as amostras não foram contaminadas durante os

processos de extração, amplificação e visualização, o que poderia conduzir a um resultado positivo falso.

- Para amostras líquidas, transfira 200 µl da amostra para um tubo eppendorf. Para amostras densas, adicione 1 ml de tampão salino, utilize o vortex e transfira 200 µl para um tubo de 1,5 ml.
- Adicione 50 µl de proteinase K (PK).
- Incube durante 30 minutos, a 56º C, agitando a 550 rpm, por outro lado e utilizando o vortex de 10 em 10 minutos.
- Transfira 250 µl de amostra para o extrator. Execute-o na unidade de extração NucliSENS™ EasyMag, selecionando a lise interna e a extração regular, de acordo com o protocolo “GENÉRICO” do fabricante. Coloque o volume de eluição a 25µl.

Se for utilizado outro sistema de extração, o volume de eluição deve ser otimizado na faixa de 20 – 30 µl.

A GENOMICA, apenas validou esta extração automática para que haja pequenas diferenças em relação a métodos diferentes.

7.2. REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO

Recomendações específicas para a amplificação:

- Trabalhe na **zona de Pré-RCP**, usando, sempre, um armário e seguindo as recomendações mencionadas na secção 5.1.
 - O ADN é, sempre, adicionado num compartimento, seguindo as recomendações mencionadas na secção 5.1. Durante o processo, mantenha os tubos separados e refrigerados.
1. Descongele um tubo de amplificação para cada amostra a analisar. Guarde no gelo e não utilize temperaturas acima de 37º C para o descongelamento.
 2. Centrifugue os tubos de amplificação durante alguns segundos, para que todo o líquido se concentre no fundo dos tubos (para o caso de não ter adaptadores de micro centrifugadores disponíveis para os tubos, podem-se utilizar tubos maiores depois de se terem cortado as respetivas tampas).
 3. Adicione 5 µl do ADN extraído a todos os tubos de amplificação e misture várias vezes com a micropipeta. Mantenha os tubos, sempre, refrigerados.
 4. Programe os seguintes ciclos de temperatura no aparelho de ciclagem térmica:

1 ciclo	95º C 15 min
45 ciclos	95º C 30 seg.
	59º C 60 seg.
	72º C 60 seg.
1 ciclo	72º C 10 min
4º C continuamente até à recolha do tubo (opcional)	

5. Inicie o programa e coloque os tubos no aparelho de ciclagem térmica quando o bloco exceder 90º C.

7.3. VISUALIZAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO NO CLART-Strip® (CS)

Recomendações específicas antes de começar a visualização:

O PROTOCOLO QUE A SEGUIR SE DESCREVE DEVE SER, SEMPRE, EXECUTADO NA **ZONA PÓS-RCP**. NÃO LEVE O PRODUTO AMPLIFICADO PARA A ZONA PRÉ-RCP.

1. Ligue o **CAR**® (CLINICAL ARRAY READER – “Leitor da Matriz Clínica”) antes de iniciar todo o processo. A autocalibragem do equipamento demora alguns minutos e é, também, necessário inserir o nome das amostras no programa, antes da leitura.
2. Certifique-se que, antes do início da hibridização, a temperatura do misturador térmico atingiu 56° C durante, pelo menos, 1 hora.
3. Mantenha a solução SH no misturador térmico a 56° C, que é a temperatura de hibridização.
4. Prepare uma nova solução de lavagem antes de cada ensaio; não volte a utilizar de novo soluções, previamente, preparadas, ou resíduos.
5. Utilize diferentes bicos filtrados para cada alvéolo e mude-os sempre que se adiciona um reagente.
6. No caso de se utilizarem bombas de vácuo equipadas com um pente de 8 bicos para a aspiração das soluções, deite fora os pentes depois de cada utilização, ou descontamine-os com uma solução diluída de lixívia a 10% depois de cada ensaio. Certifique-se que a bomba aspira adequadamente e não deixa vestígios no fundo do alvéolo.
7. Aspire as diferentes soluções, por completo, sem tocar na matriz.

VISUALIZAÇÃO:

1. Desnaturação

Coloque os tubos de amplificação no aparelho de ciclagem térmica quando este atingir 95° C e incube os tubos durante 10 min. Não ultrapasse o tempo de 10 min de desnaturação, a fim de evitar que os tubos se abram e haja o risco de contaminação.

Remova os tubos da incubação de 95° C e coloque-os, imediatamente, em gelo.

2. Preparação da solução diluída de TL

Por cada tira de CS (total de 8 alvéolos), prepare 10 ml de solução diluída de lavagem adicionando 1 ml da solução TL a 9 ml de água destilada e misture, lentamente.

3. Pré-lavagem da CS

Antes de se iniciar o ensaio, torna-se necessário lavar as tiras, adicionando, a cada alvéolo, 200 µl de solução diluída de TL. Misture-a com a pipeta multicanal 10 a 15 vezes, tendo em conta que a superfície da matriz não deve ser tocada. **Aconselha-se que esta lavagem seja efetuada enquanto as amostras amplificadas estiverem a ser desnaturadas e que a solução de lavagem se mantenha no alvéolo até as amostras poderem ser adicionadas ao mesmo.** Deite fora a solução diluída de TL com uma pipeta, ou, preferencialmente, com uma bomba de vácuo.

A matriz deve estar isenta de resíduos da solução, embora nunca deva permanecer seca. Adicione, imediatamente, a solução seguinte.

4. Hibridização

Antes de utilizar a solução SH, a mesma deve ser aquecida até aos 56° C, até à completa diluição dos sais. Uma vez desnaturados os produtos da RCP, adicione a cada alvéolo CS 100 µl da solução SH (evite a formação de espuma). Seguidamente, adicione 5 µl do produto RCP desnaturado do tubo de amplificação. Utilize uma matriz por amostra.

Misture várias vezes, tendo o cuidado para não tocar no fundo do alvéolo. Recomenda-se que se

carregue cada tira independente e separadamente das restantes, a fim de evitar contaminações. Cubra a placa de microtitulação com a tampa de plástico fornecida e incube na misturadora térmica durante **1 hora, a 56° C, agitando a 550 rpm**.

Após esta incubação, retire a placa da misturadora térmica e aspire a solução SH da CS com uma pipeta, ou, preferencialmente, com uma bomba de vácuo. A matriz deve estar isenta de resíduos da solução, embora nunca deva permanecer seca. Adicione, imediatamente, a solução seguinte. Depois da incubação, programe a misturadora térmica para 30° C e em movimento, para que possa ser utilizada, mais tarde, no passo 6.

5. Dupla lavagem

Adicione 200 µl da solução diluída de TL a cada alvéolo CS e suspenda 10 a 15 vezes com a pipeta multicanal. Deite fora a solução diluída de TL com uma pipeta, ou, preferencialmente, com uma bomba de vácuo multicanal sem deixar resíduos. **Repita o procedimento. Este passo deve ser levado a cabo com diferentes bicos para cada alvéolo, em ambas as lavagens.** Ao chegar a este passo, se a misturadora térmica não tiver atingido os 30° C, os alvéolos devem manter a solução de TL até a misturadora térmica atingir aquela temperatura.

6. Bloqueio e conjugado

Recomenda-se que a solução de elevada afinidade CJ seja centrifugada durante 10 segundos antes da sua utilização. Seguidamente, prepare a solução diluída de CJ da seguinte forma: para cada tira de CS, misture **1 ml da solução DC e 7,5 µl da solução de elevada afinidade CJ**.

Deite fora a solução diluída de TL sem deixar quaisquer resíduos da solução e adicione 100 µl da solução diluída de CJ a cada alvéolo CS. Incube durante **15 minutos exatos** na misturadora térmica, **a 30° C, agitando a 550 rpm**. Após esta incubação, retire a placa e deite fora a solução, rapidamente, com uma pipeta ou uma bomba de vácuo multicanal. Uma vez terminada a incubação, coloque a misturadora térmica a 25° C e em movimento, para que a mesma possa ser utilizada, posteriormente, no passo 8.

7. Lavagem tripla

Adicione, imediatamente, 20 µl de solução diluída de TL a cada alvéolo CS, misturando 10 a 15 vezes com a pipeta multicanal e deite fora a totalidade da solução com a pipeta ou a bomba de vácuo. **Repita o procedimento mais duas vezes.**

É **muito importante** evitar quaisquer resíduos da solução de CJ, uma vez que as mesmas podem reagir com a solução RE, gerando um sinal inespecífico.

8. Desenvolvimento com a solução RE

Retire, por completo, a solução diluída de TL e adicione 100µl de solução RE a cada alvéolo CS e incube durante **10 minutos a 25° C** na misturadora térmica, **sem agitação**.

Aviso! É muito importante a utilização da misturadora térmica, sem agitação.

9. Deite fora toda a solução TL através de uma pipeta ou um sistema de vácuo

10. CAR® (Leitor da Matriz Clínica)

Coloque na prateleira do CAR® e a placa por cima deste. Uma vez fechada a prateleira, a leitura processa-se, automaticamente.

8. LEITURA DOS RESULTADOS

Os dados obtidos de cada análise são processados, automaticamente. O sistema de leitura e análise (CAR®) disponibiliza um relatório a indicar os resultados.

O monitor apresenta uma tabela com duas colunas; na coluna da esquerda listam-se as espécies que se encontram caracterizadas na matriz. Na coluna da direita lista-se o resultado analítico: positivo, negativo,

inconclusivo, não válido.

9. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Uma das grandes desvantagens da amplificação genómica é a utilização de amostras de ADN de fraca qualidade (pela retirada de uma quantidade insuficiente da amostra, degradação do ADN devido ao armazenamento incorreto da amostra, perda do ADN da amostra durante a extração) ou a presença de inibidores da polimerase do ADN nas amostras a serem analisadas, interferindo, por isso, com a amplificação genómica, resultando, daqui, falsos negativos.

Com o estojo da *Pneumo CLART bacteria*[®] os falsos negativos são removidos pela adição de um controlo interno ao tubo de amplificação, o que é indicativo da eficácia da reação de amplificação.

Está incluído, também, no tubo, um controlo de extração genómica do ADN para detetar falsos negativos, devido a falhas na extração.

Deve ser incluído, em cada conjunto de análises, um controlo de extração negativo, para confirmar que as amostras não foram contaminadas durante a extração, amplificação e visualização, dando origem a um falso positivo.

O tubo de amplificação contém as seguintes subcapas de amplificação:

- Um par de oligonucleótidos que ampliam um fragmento do gene β -globina humano como um controlo genómico do ADN do paciente.
- Um par de oligonucleótidos que ampliam um plasmídeo modificado, incluído no tubo de amplificação, que é utilizado como controlo de amplificação da reação da RCP.
- Oligonucleótidos específicos para os alvos dos patogénicos a serem detetados.

O tubo de reação foi desenhado a fim de favorecer a amplificação de micro-organismos por comparação com os dois outros controlos. A amplificação do ADN genómico deverá ser executada entre estes dois controlos, comparando, preferencialmente com o controlo da reação de amplificação.

A razão deste desenho é:

O **controlo genómico do ADN** seria, apenas, essencial para confirmar um resultado negativo, uma vez que nos informa que a extração do ADN, a partir de amostras de fezes, foi conduzida com sucesso, ainda que não tenha havido qualquer amplificação do patogénico.

O **controlo da RCP** seria, apenas, essencial, quando não se encontra qualquer amplificação no tubo, porque ajudará a distinguir entre uma RCP inibida e uma amostra em que não esteja presente qualquer ADN.

Há 3 resultados possíveis para uma amostra:

1. Resultado positivo: a presença de determinada bactéria na amostra do paciente.
2. Resultado negativo: a ausência de determinada bactéria na amostra do paciente.
3. Resultado incerto: há três diferentes possibilidades a explicar este resultado:
 - 3.1. Incerto com o controlo de amplificação da RCP inibido. Poderá haver um problema que afete a amplificação e / ou a extração. O processo deverá ser reiniciado a partir do passo de extração.
 - 3.2. Incerto sem qualquer controlo genómico interno, devido a uma falha numa etapa da extração. Todo o processo deve ser reiniciado a partir da etapa de extração.
 - 3.3. Incerto com ambos os controlos concluídos com sucesso. Há duas possibilidades: uma em que as réplicas dos pontos na matriz são demasiado diferentes uns dos outros; outra em que a intensidade do sinal de absorvência não normalizada se encontra no limite de deteção do ensaio,

cuja amplitude foi estabelecida, especificamente, pelo software, para cada micro-organismo.

Em ambos os casos o passo de visualização deve ser repetido.

10. ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS E OPERACIONAIS

10.1. CONTROLO DE INTERFERÊNCIAS CONHECIDAS

Os falsos negativos são um dos inconvenientes na deteção pela amplificação genómica, quer devido a uma qualidade inadequada do ADN extraído (devido à quantidade insuficiente da amostra, degradação do ADN, armazenamento inadequado ou perda do ADN durante a extração), quer devido à presença de inibidores da polimerase do ADN nas amostras que devam ser processadas (álcool, sais, etc.).

A fim de se evitarem estas interferências, devem ser seguidas as indicações das secções 5, 6 e 7 deste manual.

10.2. ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS

Parâmetros de processamento:

- **Sensibilidade analítica.** A sensibilidade analítica foi determinada pela amplificação de diluições em série de plasmídeos recombinantes para cada uma das mutações detetadas pelo estojo. Cada um deles tem o produto amplificado inserido (incluindo a parte que é complementar às sondas de deteção específicas). A visualização foi efetuada no CS, dando aso aos seguintes resultados (Tabela 1):

Micro-organismo	Cópias / 5 µl
<i>Moraxella catharralis</i>	10 ²
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	10
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10 ²
<i>Haemophilus influenzae</i>	10 ²
mec A	10 ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ²
<i>Bordetella pertussis</i>	10 ²
<i>Bordetella parapertussis</i>	10 ²
<i>Bordetella holmesii</i>	10 ²
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	10 ²

Tabela 1. Relação do número de cópias do plasmídeo recombinante necessárias para obter uma sensibilidade de 100% na deteção de cada um dos micro-organismos.

- **Especificidade analítica.** Foram efetuadas experiências de especificidade em plasmídeos recombinantes, em que se observa que uma deteção inespecífica de outros micro-organismos diferentes dos que são determinados não é produzida. Por isso, considera-se que a técnica atinge uma especificidade analítica de 100%.

Parâmetros do utilitário do diagnóstico

A fim de determinar os parâmetros do diagnóstico do estojo, foi levada a cabo uma avaliação comparativa

do estojo da *Pneumo CLART bacteria*[®] contra a cultura das técnicas de referência e, ou a RCP. Para esta avaliação colaborámos com os seguintes laboratórios:

- Departamento de Microbiologia, Hospital Universitário Trías i Pujol, Badalona, Espanha.
- Departamento de Microbiologia, Hospital Universitário Ramon y Cajal, Madrid, Espanha.

A presença de cada um dos micro-organismos que foi detetado com o estojo, foi analisada a partir de material genético de amostras respiratórias. Analisámos um total de 267 amostras.

O resultado é considerado verdadeiro para cada amostra, se houver concordância entre a referência técnica e a técnica da *Pneumo CLART bacteria*[®]. As discrepâncias entre as duas técnicas foram resolvidas da seguinte forma:

- Resultado positivo para o padrão dourado e resultado negativo para a *Pneumo CLART bacteria*[®] a técnica de referência é considerada como tendo dados corretos e considera-se falso negativo para a *Pneumo CLART bacteria*[®]
- Resultado negativo para a técnica de referência e resultado positivo para *Pneumo CLART bacteria*[®] a discrepância será debatida pela RCP específica aninhada e pela sequenciação. O resultado é o que se pode considerar como verdadeiro.

Tabela 2. Sensibilidade e especificidade do diagnóstico do estojo da *Pneumo CLART bacteria*[®]

(N = 267) ¹	Padrão dourado	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	PPV (%)	NPV (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	63	89,7 ± 2,4	99,75 ± 0,25	99,1 ± 0,9	96,9 ± 0,7
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	89	89,3 ± 1,7	98,6 ± 0,3	96,9 ± 0,6	94,9 ± 0,8
<i>Haemophilus sp./H. influenzae</i>	187	96,8 ± 0,5	100	100	93,1 ± 1,1
<i>Moraxella catarrhalis</i>	77	98,7 ± 1,3	100	100	99,5 ± 0,5
<i>Bordetella pertussis</i>	10	100	100	100	100
<i>Bordetella parapertussis</i>	1	100	100	100	100

NOTA: devido à sua baixa prevalência, não tem havido amostras positivas em relação aos seguintes organismos: *Mycoplasma pneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica* e *Bordetella holmesii*. Por isso, falhou a identificação da sensibilidade do diagnóstico do estojo para estes patogénicos. Em todos os casos, a sensibilidade analítica foi avaliada pelos plasmídeos recombinantes do ADN e estirpes da colheita (colheita da DSMZ).

- **Especificidade do diagnóstico**

A técnica foi validada, tanto com amostras respiratórias negativas como com amostras respiratórias positivas, para outros micro-organismos não incluídos no estojo e os resultados não apresentaram qualquer reação cruzada com os mesmos.

- **Reprodutibilidade e repetibilidade do diagnóstico por tipo de amostra**

A reprodutibilidade e repetibilidade do diagnóstico foram processadas a partir da extração da amostra até à

¹ 175 cuspos, 12 aspirados nasofaríngeos, 6 lavagens brônquicas, 69 aspirados brônquicos, 4 exsudados nasofaríngeos, 1 secreção respiratória.

visualização na CS.

	%
Repetibilidade (n = 58)	93,7
Reprodutibilidade (n = 53)	88,7

11. BIBLIOGRAFIA

“Acute Respiratory Infection Due to *Chlamydia pneumoniae*: Current Status of Diagnostic Methods”. Swati Kumar e Margaret R. Hammerschlag. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 44:568 – 76.

“Limited Utility of Culture for *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydophila pneumoniae* for Diagnosis of Respiratory Tract Infections”. Rosemary C. She, Andy Thurber, Weston C. Hymas, Jeffery Stevenson, Janine Langer, Christine M. Litwin e Cathy A. Petti. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Setembro de 2010, p. 3380 – 3382.

“Associations between Pathogens in the Upper Respiratory Tract of Young Children: Interplay between Viruses and Bacteria” Menno R. van den Bergh, Giske Biesbroek, John W. A. Rossen, Wouter A. A. de Steenhuijsen Piters, Astrid A. T. M. Bosch, Elske J. M. van Gils, Xinhui Wang, Chantal W. B. Boonacker, Reinier H. Veenhoven, Jacob P. Bruin, Debby Bogaert, Elisabeth A. M. Sanders. *PLOS ONE*, Outubro de 2012, 7,10 .

“Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior” Juana Begoña Cacho Calvo, María Antonia Meseguer Peinado, Antonio Oliver Palomo, Jorge Puig de la Bellacasa, *Protocolos SEIMC* 2007.

“Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio superior” Ninive Batista Díaz, Ana Bordes Benítez, Oscar Díez Gil, María Lecuona Fernández, Magdalena Lara Pérez, *Protocolos SEIMC* 2006.