



CLART® PneumoVir

**CARACTERIZAÇÃO DE VÍRUS QUE CAUSAM
INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS HUMANAS
ATRAVÉS
DA IDENTIFICAÇÃO GENÓMICA
PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO**

CLART® PneumoVir

O conteúdo da presente embalagem está dentro do âmbito da protecção da Aplicação de Patente Internacional WO2009144497.

CLART®, CLART-Strip®, CAR®, SAICLART®, AUTOCLART® e PNEUMOVIR® são marcas registadas da GENOMICA.



GENOMICA, S.A.U.
Parque Empresarial Alvento, Edificio B
Calle Vía de los Poblados, 1 – 1ª planta
28033 Madrid, Espanha
www.genomica.com



Versão 11
Julho de 2015

ÍNDICE:

- 1. QUADRO DE SÍMBOLOS**
- 2. DESCRIÇÃO DO PROTOCOLO**
- 3. COMPONENTES E CONSERVAÇÃO DA EMBALAGEM**
 - 3.1. Reagentes de extracção-purificação**
 - 3.2. Reagentes de amplificação**
 - 3.3. Reagentes de visualização**
 - 3.4. Outros componentes**
- 4. MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO**
 - 4.1. Reagentes e materiais**
 - 4.2. Equipamento**
- 5. RECOMENDAÇÕES E PROCEDIMENTOS DE MANIPULAÇÃO**
 - 5.1. Recomendações gerais**
 - 5.2. Precauções para visualização**
- 6. COLHEITA DE AMOSTRAS**
 - 6.1. Lavados nasofaríngeos**
 - 6.2. Exsudados faríngeos**
 - 6.3. Exsudados nasofaríngeos**
- 7. PROTOCOLO DE TRABALHO**
 - 7.1. Extracção de material genético de vírus associado a infecções respiratórias**
 - 7.2. Extracção automática**
 - 7.3. Reacção de amplificação**
 - 7.4. Visualização do produto amplificado para CLART-Strip® (CS)**
 - 7.4.1. visualização Manaus**
 - 7.4.2. visualização com o autocart®**
- 8. LEITURA DOS RESULTADOS**
- 9. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**
- 10. ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS E DE FUNCIONAMENTO**
- 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. QUADRO DE SÍMBOLOS



Verificar as instruções de utilização



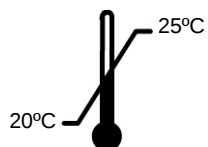
Prazo de validade



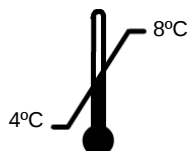
Dispositivo medico para diagnóstico *In Vitro*



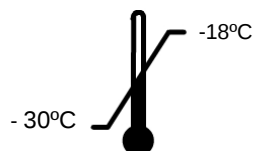
Nº de Lote



Conservar à temperatura ambiente



Conservar entre 4°C e 8°C



Conservar entre -30°C a -18°C

2. DESCRIÇÃO DO PROTOCOLO

O dispositivo **CLART® PneumoVir** é capaz de detectar e caracterizar a presença de 19 tipos mais frequentes de vírus humanos que causam infecções respiratórias nas amostras clínicas mais comuns, incluindo a detecção específica do subtipo novo de Influenza A (H1N1/2009).

Os vírus analisados são: **Adenovirus, Bocavirus, Coronavirus, Enterovirus (Echovirus) Influenza vírus A (subtipos H3N2 humano, H1N1 humano, B, e C e H1N1/2009), Metapneumovirus (subtipos A e B); vírus 1, 2, 3 e 4 Parainfluenza (subtipos A e B), Rhinovirus; Vírus Sincial Respiratório Tipo A (RSV-A); Vírus Sincial Respiratório tipo B (RSV-B).**

A detecção do produto amplificado por RT-PCR é efectuada através da utilização de uma nova plataforma baseada em baixa densidade: CLART® (Clinical Arrays Technology). A plataforma baseia-se num princípio muito simples, mas muito rentável. Consiste em incluir um microarray no fundo de um poço de placa microtitulada (CLART-Strip® -CS) (Figura 1), este sistema simplifica consideravelmente o processo de hibridização e visualização quando comparado com os sistemas de microarrays clássicos



Figura 1. Plataforma CLART® no formato de tiras de 8 poços (CS).

Este tipo de tecnologia permite a detecção simultânea de múltiplos marcadores de utilidade diagnóstica e dos controlos necessários para assegurar a fiabilidade dos resultados obtidos.

O sistema de detecção **CLART® PneumoVir** baseia-se na precipitação de um produto insolúvel naquelas zonas de micro-array onde se produz a hibridização dos produtos amplificados por sondas específicas. Durante a RT-PCR, os produtos amplificados são marcados com biotina. Após a amplificação, hibridizam-se com as suas sondas específicas respectivas que estão imobilizadas em locais conhecidos e concretos de micro-array, após o qual são incubadas com conjugado estreptavidina-peroxidase. O conjugado liga-se através da estreptavidina com a biotina presente nos produtos amplificados (que também se encontram ligados às suas sondas específicas) e a actividade peroxidase provoca o aparecimento de um produto insolúvel que precipita nos locais de hibridização de micro-array (Figura 2).

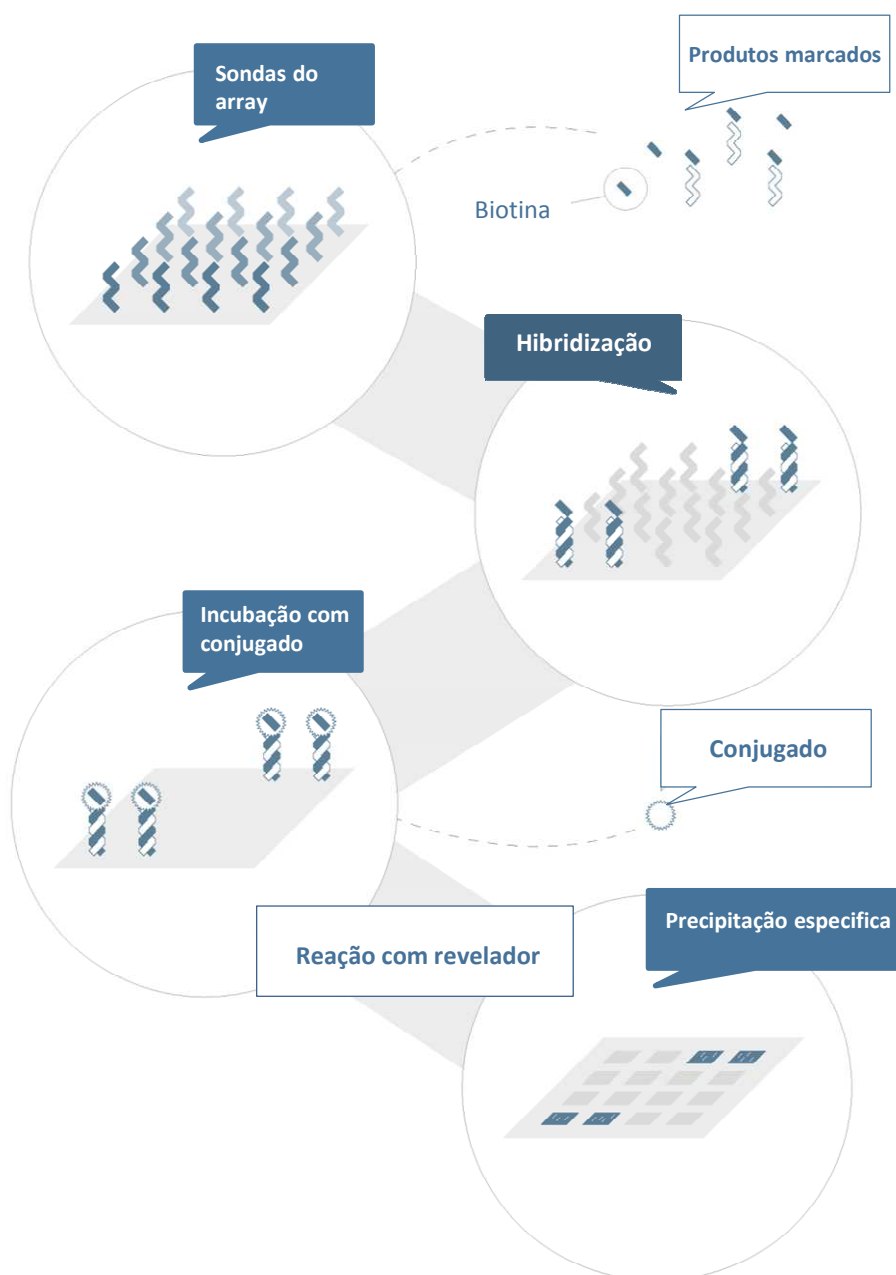


Figura 2: Esquema do método de visualização. As sondas, imobilizadas sobre a superfície, capturam os seus produtos amplificados complementares marcados com biotina. Através da biotina, liga-se o conjugado, neste caso estreptavidina-HRP (HorseRadish Peroxidase). O substrato o-Dianisidina através da acção da HRP, produz um precipitado sobre o local de hibridização.

3. COMPONENTES DA EMBALAGEM E CONSERVAÇÃO

O dispositivo **CLART® PneumoVir** contém reagentes suficientes para a extração e a análise de 24 a 96 amostras clínicas. Os reagentes incluídos na embalagem estão agrupados em várias caixas, dependendo da temperatura de conservação. Todos os reagentes permanecem estáveis até ao prazo de validade da embalagem, desde que sejam respeitadas as recomendações de conservação.

4.1. Reagentes de extração-purificação

O dispositivo de purificação-extração é expedido a – 20º C e deve ser conservado a esta temperatura até ser utilizado.

- **SEML** (Solução de extração). **Uma vez descongelado, deve ser conservado a 4º C e utilizado dentro de 8 dias.**
- **SD** (Solução de diluição). Conservar a –20º C ou 4º C.
- **Isopropanol**. Conservar a –20º C.
- **Etanol a 70%**. Conservar a –20º C.

4.2. Reagentes de amplificação

São expedidos e conservados a –20º C.

- **Tubos de amplificação** prontos a usar. Contêm 45 µl de mistura de reacção. Deve apenas ser descongelado sobre gelo o número de tubos de amplificação necessário, conservando os tubos restantes a – 20º C

São expedidos dois tipos de tubos de amplificação

- **Tubo incolor** (multiplex-PCR 1) para a amplificação de Coronavirus; Metapneumovirus (subtipos A e B); Parainfluenza virus 1, 2, 3 e 4 (subtipos A e B) e RSV-A.

Advertência: A mistura enzimática deve ser adicionada antes da introdução do material genético extraído.

- **Tubo de cor** (multiplex-PCR 2) para a amplificação de Adenovírus; Bocavírus; Enterovírus (Echovirus); Influenza virus A, B e C; Rhinovirus e RSV-B.

Advertência: A mistura enzimática deve ser adicionada antes da introdução do material genético extraído.

- **Mistura enzimática** (trata-se de uma mistura de **RT** (retrotranscriptase) e **Polimerase ADN**. Pronto a usar. Conservar a – 20º C.

4.3. Reagentes de visualização

O dispositivo de visualização é expedido a 4º C.

AVISO: Após receber os CLART-Strip® (CS) estes devem ser conservados à temperatura ambiente.

- **CLART-Strip® (CS)** (incluem as sondas específicas). São enviados num envelope selado. **Depois de aberto, o envelope deve ser fechado e conservado à temperatura ambiente (25ºC máx.), protegido da luz.**

- **SH** (Solução de hibridização). **Conservar a 4º C.**
- **DC** (Diluyente do conjugado). **Conservar a 4º C.**
- **CJ** (Conjugado). **Conservar a 4º C.** Centrifugar antes de utilizar.
- **RE** (Solução de revelação). **Conservar a 4º C.**
- **TL** (Tampão de lavagem). **Conservar a 4º C.**

4.4. Outros componentes

Para a captura e posterior processamento da imagem são necessários os seguintes componentes:

- **CAR®** (CLINICAL ARRAY READER) (figura 3): Este leitor foi concebido para utilização exclusiva com os dispositivos de diagnóstico de GENOMICA. É distribuído pela GENOMICA.
- **SAICLART®**: software desenvolvido e validado pela GENOMICA para processamento de imagens.
- Software específico do dispositivo **CLART® PneumoVir** concebido e validado pela GENOMICA



Figura 3. CAR® (CLINICAL ARRAY READER)

5. MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

Encontra-se abaixo a lista de material necessário mas não fornecido.

5.1. Reagentes e materiais

- Água destilada
- Solução salina
- Luvas descartáveis
- Pontas de pipeta com filtro ou pipetas de deslocação positivas
- Recipiente para gelo picado
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml autoclavados
- Grelha para tubos de 1,5 mL
- Suporte para tubos de 0,5 mL/0,2 mL

5.2. Equipamento

- O equipamento que se segue é necessário para a fase de visualização automática. O autoclart® (Figura 4) permite o processamento automático de 12 tiras ou 96 amostras.

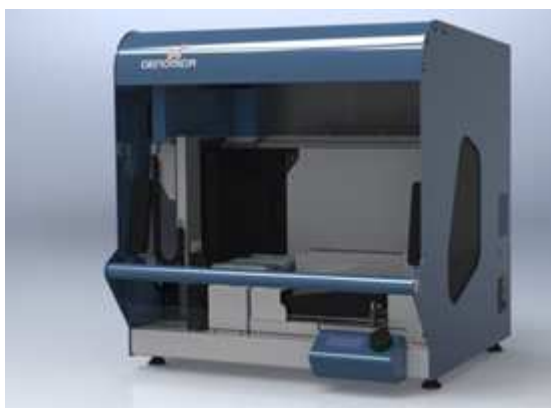


Figura 4 – autoclart®

- Microcentrífuga
- Termociclador
- Câmara de fluxo laminar para o laboratório de extracção
- Três micropipetas ajustáveis entre 1-20 µL, 20-200 µL, e 200 – 1000 µL para laboratório de extracção.
- Uma micropipeta ajustável entre 1-20 µL para adicionar a mistura de enzimas aos tubos de amplificação.
- Uma micropipeta ajustável entre 1-20 µL para adicionar o material genético aos tubos de amplificação

- Três micropipetas ajustáveis entre 1-20 µL, 20-200 µL, e 200 – 1000 µL para o laboratório de visualização.
- Bloco de aquecimento com agitação; temperaturas ajustáveis (25º C, 30º C, 50º C, 53º C e 59º C). Compatível com tubos do tipo Eppendorf de 1,5 ml e Placas de Microtitulação de 96 poços.
- Vortex
- Sistema de vácuo (opcional)

5. RECOMENDAÇÕES E PROCEDIMENTOS DE MANIPULAÇÃO

Muito importante de modo a evitar a contaminação! Ler cuidadosamente antes de iniciar a análise.

5.1. Recomendações gerais

1. **Esta análise deve ser efectuada em QUATRO áreas separadas fisicamente**, de modo a evitar a contaminação entre amostras com o produto amplificado anteriormente. Cada uma das áreas deve ter o seu próprio material de trabalho identificado (pipetas, pontas, tubos, suportes, luvas, etc.) que nunca devem ser utilizadas fora destas áreas.
 - **Área de extracção Pre-PCR:** a extracção de ADN/ARN ocorre nesta área. Deve ser utilizada uma câmara de fluxo laminar.
 - **Área Pre-PCR de preparação dos tubos de amplificação:** Nesta área adiciona-se aos tubos de amplificação a mistura de enzimas. Recomenda-se a utilização de uma câmara de fluxo laminar.
 - **Área Pre-PCR de adição do material extraído:** Nesta área, adiciona-se o ADN/ARN extraído aos tubos de amplificação onde a mistura enzimática foi previamente introduzida. Deve ser utilizada uma câmara de fluxo laminar.
 - **Área Pós-PCR:** nesta área é efectuada a amplificação e visualização do produto amplificado.
2. **Utilizar sempre luvas.** É aconselhado substituir as luvas com uma determinada frequência e obrigatoriamente cada vez que começar a trabalhar nas áreas anteriormente descritas. As luvas novas devem ser utilizadas para a preparação dos tubos de amplificação e de cada vez que for adicionado ADN/ARN a estes.
3. **Limpar as áreas de trabalho** (bancadas de laboratório, câmara de fluxo laminar, suportes, pipetas) em profundidade com desinfetante diluído **a seguir a cada processamento de amostras**; desinfetar obrigatoriamente as áreas de trabalho em caso de contaminação. E altamente recomendada a limpeza antes e depois da sua utilização dos termomixer e termociclador.
4. Utilizar sempre pontas com filtro ou pipetas com escoamento parcial para evitar contaminações. Devem ser utilizadas pipetas distintas em cada área. **Eliminar** a ponta da micropipeta após pipetagem.
5. **Utilizar material de laboratório autoclavável e descartável.**

6. **Nunca misturar reagentes de dois tubos diferentes mesmo que pertençam ao mesmo lote.**
7. **Fechar os tubos de reagente imediatamente após utilização, de modo a evitar a contaminação.**
8. **Eliminar a ponta da micropipeta após pipetagem.**
9. **A GENOMICA** não pode ser considerada responsável pelos resultados obtidos com este dispositivo, se forem utilizadas outras amostras que não as indicadas ou com um ADN/ARN extraído por outro protocolo que não o indicado.

5.2. Precauções para a extração e adição de material extraído para o tubo de amplificação

1. Usar sempre luvas
2. Limpar as superfícies de trabalho das câmaras com solução de lixívia diluída a 10%.
3. Ligar o fluxo laminar e a luz UV, pelo menos, 20 minutos antes da extração. Desligar a luz UV quando estiver a trabalhar dentro da câmara.
4. A preparação das amostras antes da extração deve ser efetuada dentro da câmara.

5.3. Precauções para a visualização

1. Evitar que a ponta da pipeta ou do sistema de vácuo toque no fundo do tubo, já que pode danificar o micro-array fixado no fundo.
2. Aconselha-se a adição de todas as soluções às paredes do CS, nunca directamente ao fundo.
3. É conveniente não adicionar a solução SH até à adição de produtos desneutralizados de PCR.
4. Após a incubação com a solução CJ, é muito importante lavar o CS assim como as tampas para evitar que caiam resíduos deste que podem reagir com a solução RE, resultando numa precipitação inespecífica que pode levar a falsas interpretações do resultado.
5. Evitar bolhas na superfície do microarray ao adicionar qualquer solução.
6. Manter limpa a base do CS para evitar possíveis interferências durante a leitura dos resultados.
7. Ao visualizar a imagem no leitor, confirmar que aparecem os marcadores de posição e que não há bolhas de ar ou manchas que interfiram na leitura. Caso contrário, limpar o fundo do tubo por fora com um papel de celulose, bater suavemente no tubo com o dedo.

6. COLHEITA DE AMOSTRAS

6.1. Lavado nasofaríngeo

Introduzir 3 a 7 ml de solução salina estéril na fossa nasal, mantendo a cabeça do doente para trás, e efectuar a colheita da solução num contentor estéril colocado abaixo das fossas nasais, inclinando a cabeça para a frente. Conservar a amostra a 4º C se for processada no dia ou a – 80º C se for processada posteriormente.

6.2. Exsudado faríngeo

Para a colheita de exsudado faríngeo (que é o segundo produto mais habitual para a detecção de vírus respiratórios após o lavado nasofaríngeo), utiliza-se uma espátula de madeira de modo a evitar a contaminação com a saliva, e colhe-se a amostra da zona posterior da faringe nas zonas inflamadas e eritematosas ou onde existam lesões visíveis, girando a zaragatoa e tentando colher células epiteliais da lesão. No caso de haver exsudados ou resíduos mucosos aderentes às lesões, devem ser retirados com outra zaragatoa antes de proceder à colheita da amostra. Introduzir a zaragatoa no tubo com o meio de conservação. Manter a 4º C se pretender processar a amostra no próprio dia, ou a –80º C se pretender processar a amostra posteriormente.

6.3. Exsudado nasofaríngeo

Para a colheita de amostra de exsudado nasofaríngeo insere-se uma zaragatoa flexível no nariz e abaixo da faringe, rodando suavemente várias vezes. Introduzir a zaragatoa no tubo com o meio de transporte. Conservar a 4º C se pretender processar a amostra no próprio dia, ou a – 80º C se pretender processar a amostra posteriormente.

7. PROTOCOLO DE TRABALHO

De modo a otimizar resultados, é necessária a quantidade mínima de 5-10 ng/µl DNA/RNA, independentemente de ser efectuada manual ou automaticamente.

7.1. Extracção de material genético de uma amostra clínica

Recomendações específicas antes de iniciar a extracção:

- Trabalhar na **área de extracção pre-PCR**, utilizando sempre uma câmara de fluxo laminar e seguindo as recomendações mencionadas na secção 6.1.
- Manter as amostras em gelo e bem separadas.
- Adicionar os reagentes pela ordem indicada.
- Não utilizar solução salina para as zaragatoas.

Protocolo de extracção:

1. Incluir em cada série de amostras um controlo negativo, constituído por 200 µl de água isenta em ARN e processar de igual modo que as restantes amostras.
2. Pipetar 200 µl de amostra clínica. No caso das zaragatoas com meio de transporte, homogeneizar em vortex durante 30 segundos e depois pipetar 200 µl.
3. Adicionar 600 µl de SEML (solução de extracção de amostras líquidas). Esperar que a solução descongele e se torne transparente antes de usá-la. Homogeneizar invertendo os tubos várias vezes e esperar 15 minutos à temperatura ambiente.
4. Adicionar 600 µl de isopropanol (conservado a –20º C), misturar invertendo os tubos várias vezes e centrifugar, preferencialmente a 4º C, a 13000 rpm durante 20 minutos.

5. Aspirar o sobrenadante com a micropipeta. Pode utilizar a micropipeta de 1000 µl para eliminar o sobrenadante, no final, pode utilizar uma micropipeta mais pequena de 20 µl, para retirar os resíduos do fundo do tubo sem remover o precipitado.
6. Adicionar 1000 µl de etanol a 70% (armazenado a – 20º C). Agitar ligeiramente para limpar o precipitado do fundo.
7. Centrifugar preferencialmente a 4º C, a 13000 rpm durante 15 min.
8. Eliminar o sobrenadante cuidadosamente como indicado no ponto 4. Deixar secar na câmara durante 15 a 20 minutos até que não haja resíduos de etanol. Antes de suspender de novo a amostra, confirmar que não há resíduos de etanol.
9. Suspender de novo em 20 µl de Solução de Diluição.

7.2. Extracção automática

Consultar as recomendações e protocolo fornecidos pelo fornecedor do extractor e verificar se o material extraído preenche os requisitos do protocolo *CLART® PneumoVir*.

7.3. Amplificação por RT-PCR

Recomendações específicas para a amplificação:

- Trabalhar na **área pre-PCR de preparação dos tubos de amplificação**, sempre na câmara e seguindo as recomendações do ponto 6.1
- Ter especial cuidado ao adicionar a mistura à enzima, já que contém uma elevada percentagem de glicerol. Pelo que, se se introduzir demasiado a ponta da pipeta, a mistura adere às paredes provocando, por um lado, que se adicione mais mistura do que o necessário ao tubo de reacção, e por outro, que se produza uma perda de produto, podendo dar-se o caso de não ter volume suficiente para o resto dos tubos de amplificação do dispositivo.
- Adicionar o ADN/ARN na **área pre-PCR de adição do material extraído**, sempre na câmara e seguindo as recomendações do ponto 6.1 Durante o processo, manter os tubos separados em gelo.

Protocolo da Reacção de Amplificação

1. Para cada amostra a ser processada, descongelar e manter no gelo 2 tubos de amplificação (um incolor e outro de cor).
2. Centrifugar tubos de reacção na microcentrífuga durante alguns segundos, para que todo o líquido atinja o fundo do tubo. No caso de não haver adaptadores de microcentrífuga disponíveis para os tubos de reacção, podem ser utilizados tubos maiores, após ter retirado a sua tampa.
3. **Adicionar 2 µl da mistura de enzima aos tubos incolor e de cor.**
4. Adicionar **5 µl** de ARN/ADN extraído a cada um dos tubos de reacção, e suspender de novo várias vezes com a micropipeta. Deixar os tubos no gelo.
5. Programar no termociclador os seguintes ciclos de temperaturas:

1 ciclo	45º C 45 min. 95º C 15 min.
45 ciclos	95º C 0,5 min. 50º C 1,5 min. 68º C 1,0 min.
1 ciclo	68º C 10 min.
4º C continuamente até à colheita dos tubos (opcional)	

O tempo de amplificação é de, aproximadamente, 5 horas, mas pode variar ligeiramente dependendo do termociclador.

7.4. Visualização do produto amplificado para as CLART-Strip® (CS):

Recomendações específicas antes de iniciar o processo de visualização:

O PROTOCOLO DESCRITO A SEGUIR DEVE REALIZAR-SE SEMPRE NUMA ÁREA **PÓS-PCR**. NUNCA TRANSPORTAR O PRODUTO AMPLIFICADO PARA A ÁREA DE PRÉ-PCR.

1. Ligar o CAR® (CLINICAL ARRAY READER) antes de iniciar o procedimento. A auto-calibração do equipamento leva uns minutos, e é necessário introduzir o nome das amostras no programa antes da leitura.
2. Assegurar-se de que, antes de iniciar a hibridização, a temperatura do termomixer atingiu os 59º C durante, pelo menos, 1 hora.
3. Aquecer a SH (solução de hibridização) no termomixer (59Cº)
4. Preparar a **solução de lavagem antes** de cada análise, não utilizar soluções anteriores ou quaisquer soluções remanescentes de análises anteriores.
5. Utilizar uma ponta com filtro diferente para cada poço e substituí-la de cada vez que se adicionar um reagente.
6. O pente de 8 pontas utilizado na bomba de aspiração deve ser descartado após utilização ou descontaminado com uma solução de lixívia a 10% após cada análise. Certificar-se de que o sistema de vácuo funciona corretamente e não deixar restos de líquido nos poços.
7. Todos os tampões devem ser completamente aspirados dos poços sem tocar no fundo.

7.4.1 visualização Manaus

1. Desnaturação: Colocar os tubos de amplificação no termociclador quando tiver atingido 95°C e incubar os tubos durante 10 min. Não exceder 10 min. de tempo de desnaturação para prevenir que os tubos sejam abertos e que possa ocorrer a contaminação.
Retirar os tubos da incubação aos 95° C e colocá-los imediatamente no gelo.
2. Preparação da Solução TL diluída: Preparar 10 mL/tira de Solução TL no momento, diluindo 1 mL TL em 9 mL de água destilada.
3. Pré-lavagem dos AS: Pré-Lavagem das CS: Antes de iniciar a análise, é necessário efetuar uma pré-lavagem das CS, adicionando 200 µl de solução TL diluída por poço. Após a adição, homogeneizar a solução diluída 10 a 15 vezes com a ajuda da pipeta, evitando tocar na superfície da Strip. Aspirar a solução diluída TL com o sistema de vácuo e verificar que os poços ficam completamente limpos sem líquido no fundo. Adicionar o tampão logo de seguida da seguinte forma:
4. Hibridização:
A Solução de Hibridização (SH) deve ser aquecida a 59° C de modo a dissolver os sais cristalizados.
Uma vez desnaturados os produtos PCR, adicionar 100 µl de Solução SH (à temperatura ambiente) a cada poço, evitar que se forme espuma. Adicionar 3 µl de cada tubo amplificado (incolor e de cor) à CLART®Tira.

Homogeneizar várias vezes para misturar bem com a solução de hibridização, sem tocar na array. Incubar no bloco de aquecimento durante **1 hora** a 59° C, agitando a 550 rpm.

Após a incubação, retirar as tiras e eliminar a Solução SH com a pipeta ou com o sistema de vácuo. Programar o bloco de aquecimento a 30° C e deixá-lo em funcionamento para poder ser utilizado mais tarde na etapa 6. Pode retirar a tampa para que arrefeça mais rapidamente.
5. Lavagem: lavar duas vezes cada poço CS com 200 µl de Solução TL diluída, homogeneizar 10 a 15 vezes com a pipeta. Eliminar a solução TL diluída com pipeta ou preferencialmente com sistema de vácuo, deixando um volume. No caso do bloco de aquecimento não ter atingido uma temperatura de 30° C ao chegar a esta etapa, deixar os poços cheios com esta solução TL diluída até o bloco de aquecimento ter atingido a temperatura necessária.
6. Bloqueador e conjugado: é aconselhado centrifugar a solução CJ durante 10 segundos antes de utilizá-la. Em seguida, preparar a solução CJ diluída. Misturar num tubo **1 mL de solução DC e 7,5 µl de solução CJ** para cada tira. Quando conservada a 4° C, a Solução CJ diluída permanece estável durante 4 horas após a preparação. Não utilizar se este tempo for ultrapassado.

Adicionar 100 µl de Solução CJ diluída a cada poço. Incubar durante exactamente 15 minutos a 30° C, agitando a 550 rpm. Após esta incubação, eliminar **rapidamente** a solução do poço utilizando uma pipeta ou sistema de vácuo. Deixar o bloco de aquecimento arrefecer até aos 25° C para sua posterior utilização na etapa 9.

7. Lavagem tripla: **Adicionar imediatamente** 200 µl de Solução TL diluída cada poço e homogeneizar 10 a 15 vezes com a pipeta; em seguida, eliminar a solução utilizando a pipeta ou o sistema de vácuo. **Se esta lavagem não for efectuada rapidamente, pode causar sinais ilegíveis durante a leitura.**

É muito importante que o tampão CJ diluído seja completamente removido dos poços, uma vez que este pode reagir com o tampão RE produzindo um sinal inespecífico.

8. Revelação com Solução RE: Remover a Solução TL, adicionar 100 µl de solução RE a cada array do CS e incubar 10 minutos a 25° C no bloco de aquecimento **sem agitação**.

ADVERTÊNCIA! É muito importante utilizar o bloco de aquecimento sem agitar e ler as amostras imediatamente após incubação.

9. Eliminar a Solução RE com pipeta ou sistema de vácuo. O microarray deve ficar seco.
10. CAR® (CLINICAL ARRAY READER): Colocar a Strip no CAR®, este irá analisar os *Arrays* automaticamente.

7.4.2. A visualização com o autoclart®

Desnaturação: Utilize o aparelho de ciclagem térmica para desnaturar os tubos de amplificação. Coloque os tubos de amplificação no aparelho de ciclagem térmica e, quando o mesmo atingir 95° C, incube os tubos durante 8 minutos. Retire os tubos da incubação a 95° C e coloque-os, imediatamente, no gelo. Desnature o produto de amplificação antes de colocar os reagentes de visualização no autoclart®:

Ligue o equipamento autoclart® e siga as instruções apresentadas no ecrã:

1. Feche a porta e carregue no botão.
2. Selecionar “Run Program” (acionar o Programa), a partir do menu principal.
3. Selecione o ensaio ***PneumoVir Test*** de entre os constantes na lista.
4. Selecione o alvéolo da tira onde vai ter início o processamento do ensaio: A1 ou E1, para o caso dos 4 primeiros alvéolos já estarem processados.
5. Selecione a quantidade de amostras a serem processadas. Com o autoclart®, o utilizador pode processar de 4 até 96 amostras por processamento. Em qualquer dos casos as amostras devem ser múltiplos de quatro.
6. Confirme se a quantidade de amostras e o alvéolo de arranque (A1 ou E1) estão corretos.
7. Coloque o suporte dos bicos (cheio) em posição.
8. Carregue a microchapa da matriz no suporte. Certifique-se que o fecho está seguro, a fim de se poder trancar a chapa.
9. Verifique se ambos os recipientes, do desperdício de bicos e desperdício de líquidos, estão vazios e em posição.
10. Encha a garrafa de DI com 250 ml de água destilada.
11. Adicione cada reagente ao respetivo recipiente específico. O autoclart® calcula os volumes específicos necessários, de acordo com a quantidade de amostras indicadas:

TL (Tampão de Lavagem). O volume apresentado no ecrã indica o tampão de lavagem

diluído necessário. Para preparar o tampão de lavagem diluído, dilua, por favor, 1:10 do reagente TL fornecido em água destilada;

SH (solução de hibridização). Pronto para utilizar. Adicione o volume especificado no recipiente, uma vez temperado.

CJ (Conjugado). Recomenda-se que se centrifugue, por breves momentos, o CJ, antes de o utilizar. O ecrã apresenta o volume final do CJ diluído a adicionar, o que significa que cada ml indicado no ecrã deve ser preparado da seguinte forma: 1 ml de DC (Diluyente do Conjugado) e 5 µl de reagente CJ. Centrifugue a solução diluída para que a mesma fique completamente misturada.

RE (Reagente). Adicione o volume de RE indicado no ecrã.

12. Feche a porta e carregue no botão para iniciar o programa.

O dispositivo inicia a preparação do sistema. Em seguida, efetua as pré-lavagens do CJ e adiciona a solução de hibridização. Uma vez terminados estes passos, o dispositivo emite um bipe como sinal para o utilizador adicionar as amostras sobre o CS. O autoclart® continuará a emitir bipes até o utilizador abrir a porta.

13. Para a adição das amostras sobre o CS, retire, cuidadosamente, a placa do autoclart® e adicione cada um dos seguintes volumes dos produtos desnaturados, da mesma amostra, para o mesmo alvéolo. Misture com cuidado para não tocar na matriz e para colocar a microchapa de novo no autoclart®. Carregue no botão para continuar com o processo de visualização.
14. Uma vez terminado o processo de visualização, a autoclart® emitirá um bipe, indicando o fim do programa. Retire, com cuidado, a microplaca e proceda com o passo da leitura do CAR®.
15. CAR® (CLINICAL ARRAY READER – “Leitor da Matriz Clínica”): Colocar a Strip no CAR®, este irá analisar os *Arrays* automaticamente.

8. LEITURA DOS RESULTADOS

O processamento dos dados obtidos a partir de cada uma das análises, efectua-se de modo automático. O sistema de leitura e análise apresentará o relatório onde se indicam os resultados.

O monitor do sistema apresenta uma tabela de três colunas; na coluna da esquerda aparecem as espécies de vírus e os subtipos caracterizando no microarray. Na coluna do centro aparece o resultado positivo ou negativo para cada espécie de vírus e na da direita aparece a validação da amostra conferida pelo controlo de extracção ADN/ARN e de amplificação.

9. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Um dos principais inconvenientes da detecção por amplificação genómica é a utilização de amostras de ADN/ARN de qualidade reduzida (quantidade insuficiente de ADN/ARN), degradação de ADN/ARN da amostra durante a extracção, ou a presença de inibidores de polimerase ADN (hemoglobina, restos de parafina, sais, etc.) nas amostras a serem analisadas, interferindo assim com a amplificação e resultando em falsos negativos.

O dispositivo **CLART® PneumoVir** contém controlos internos que permitem verificar reacções de inibição de PCR.

Quando os vírus estão presentes na amostra, a amplificação dos genótipos é predominante em relação à amplificação dos controlos. Assim, em determinadas condições (por exemplo quando há um número elevado de cópias de um vírus ou quando há vários tipos de vírus nas amostras) os controlos internos podem não aparecer (**SEM SINAL**).

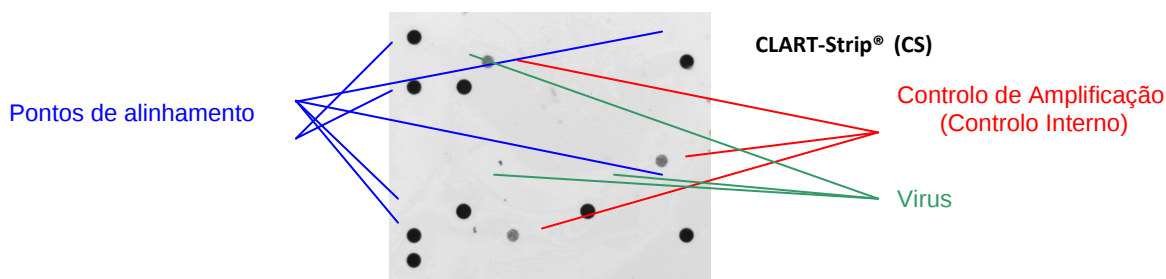
Considerando todas estas informações, podemos interpretar os resultados da leitura como:

1. Amostras Positivas

1.1. Com controlo de amplificação positivo

Vírus	Resultado	Controlo
Espécie	Positivo	Conforme

Controlo	Sinal	Resultado
Controlo Interno	> 0.165	Conforme

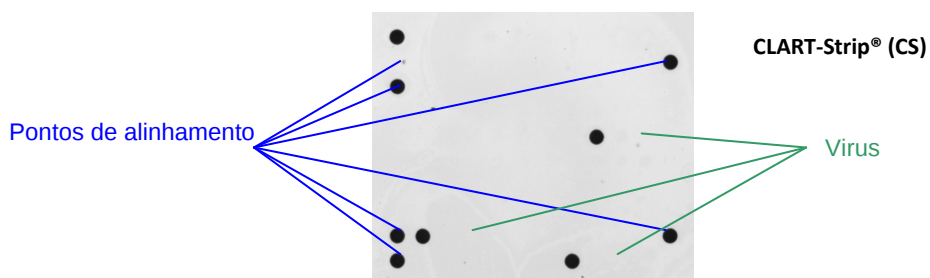


Este é um **RESULTADO VÁLIDO**. O resultado pode ser considerado como um positivo real.

1.2. Com controlo de amplificação negativo

Vírus	Resultado	Controlo
Espécie	Positivo	Conforme

Controlo	Sinal	Resultado
Controlo Interno	< 0.165	Sem sinal



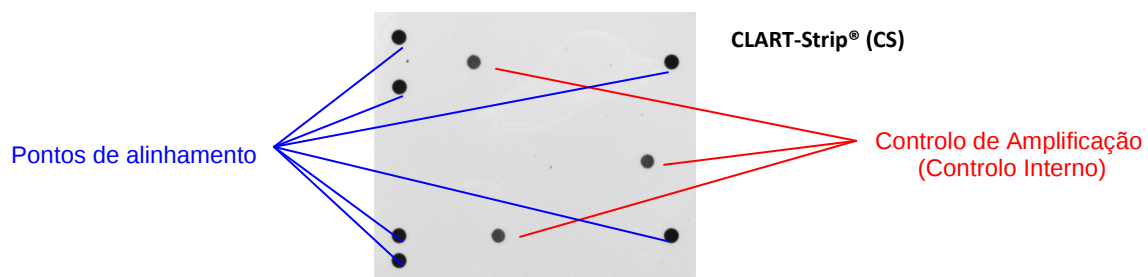
Mesmo se o Controlo Interno não aparecer, os resultados podem ser considerados válidos. Tal é devido à competição entre alvos durante o processo de amplificação.

Trata-se de um RESULTADO POSITIVO REAL.

2. Amostras negativas

Virus	Resultado	Controlo
Espécie	Negativo	Conforme

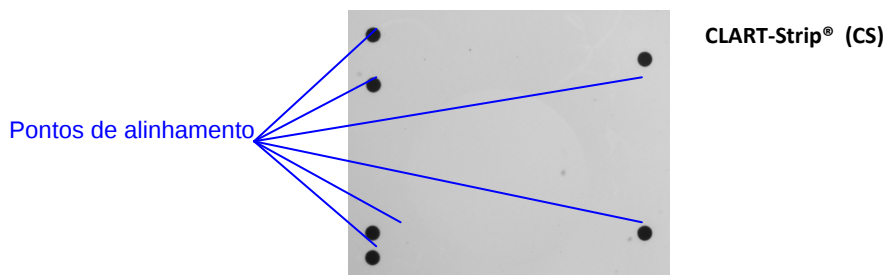
Controlo	Sinal	Resultado
Controlo Interno	> 0.165	OK



É considerado como um **RESULTADO VÁLIDO**. Neste caso, o resultado pode ser considerado como um NEGATIVO REAL.

3. Amostras inadequadas, inibidas.

Virus	Resultado	Controlo
Espécie	Negativo	PCR Inibido



É considerado como um **RESULTADO INVÁLIDO**.

O processo de amplificação foi influenciado, uma substância desconhecida pode ter a enzima polimerase de ADN inibida.

Nesta altura, é aconselhado verificar a presença de quaisquer substâncias inibidoras de PCR na amostra ou no material extraído. Se for o caso, extrair a amostra novamente ou solicitar ao médico para repetir o processo de colheita novamente.

Existem três possibilidades de obter um **Resultado Inválido**:

- Nos casos em que as réplicas do vírus são muito diferentes umas das outras (forma e intensidade).
- Em co-infecções com mais de 5 vírus.
- Quando o sinal de absorvância do material está no intervalo estabelecido como inválido para cada tipo de vírus.

10. ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS E DE FUNCIONAMENTO

10.1. Controlo de interferências conhecidas:

Existem substâncias que podem interferir na detecção durante a utilização do dispositivo **CLART® PneumoVir**. Tratam-se principalmente de substâncias que inibem a mistura de enzimas e, portanto, a reacção de amplificação. As interferências mais conhecidas são:

- **Utilização de amostras inadequadas.** A análise de qualquer outro tipo de amostra clínica que não as especificadas no manual do dispositivo **CLART® PneumoVir**, bem como colheitas incorrectas, podem produzir um resultado de análise inválido ou não conclusivo devido à falta de amplificação em consequência de colheita reduzida ou por inibição da reacção.
- **A conservação inadequada das amostras** pode influenciar o resultado da análise. Se as amostras forem submetidas a condições que possam dar lugar a reacções de degradação do ADN/ARN; o resultado da análise pode levar a um falso negativo.
- A presença tanto de hemoglobina como etanol após a extracção de ADN/ARN pode levar a inibições de PCR. Este problema pode ser evitado purificando e secando o ADN/ARN.

10.2 Especificidades técnicas

Parâmetros Analíticos

- **Sensibilidade analítica.** A sensibilidade analítica dos tipos de vírus detalhados no quadro 1 foi determinada através da amplificação das diluições em série do ADN de plasmídeos recombinantes. Cada um deles contém o produto amplificado inserido (incluindo a parte complementar da sonda específica de detecção). A etapa de visualização foi efectuada em Tiras CLART®, obtendo os mesmos resultados que estão resumidos no quadro a seguir.

Vírus associados a Infecções Respiratórias	Nº de cópias de plasmídeo recombinante por reacção de PCR
<i>Metapneumovirus</i>	100
<i>Coronavirus</i>	
<i>Influenza virus A (H1N1 humano, H3N2 humano, Influenza A H1N1/2009)</i>	
<i>Influenza virus B</i>	
<i>Influenza virus C</i>	
<i>Parainfluenza virus 4</i>	
<i>VRS-A</i>	
<i>VRS-B</i>	
<i>Adenovírus</i>	
<i>Bocavírus</i>	
<i>Enterovirus (Echovirus)</i>	1000
<i>Parainfluenza virus 1</i>	
<i>Parainfluenza virus 2</i>	
<i>Parainfluenza virus 3</i>	
<i>Rhinovirus</i>	

Tabela 1: Relação entre o número de cópias do plasmídeo recombinante (especificadas por tipo vírus) necessárias para obter uma sensibilidade de 100% na detecção de cada um dos vírus.

- **Especificidade analítica.** Os ensaios de especificidade foram efectuados com os 17 plasmídeos recombinantes e foi observado que não haviam casos de detecção inespecífica de vírus que não os que eram para determinar. Assim, consideramos uma especificidade analítica de 100%.

Parâmetros de utilidade diagnóstica:

Para determinar os parâmetros de diagnóstico do dispositivo, efectuou-se uma avaliação comparativa da técnica **CLART® PneumoVir** com as técnicas mais amplamente utilizadas nos hospitais: Imunofluorescência, Imunocromatografia, Q-PCR, **CLART® PneumoVir**, sem Influenza A H1N1/2009, e **CLART® Fluavir**. Os seguintes hospitais colaboraram para esta avaliação:

- Serviço de Microbiologia do Hospital Universitário Germans Trias i Pujol, Badalona (Espanha)
- Serviço de Virologia do Hospital Universitário da *Virgen de la Arrixaca*.
- Serviço de Virologia do Hospital Universitário de Reims (França).

O material genómico foi extraído de 296 amostras, lavados nasofaríngeos e analisado para detectar a presença de todos os vírus presentes na Tabela 2.

Quando ambos os resultados, o método alternativo e **CLART® PneumoVir**, apresentaram o mesmo resultado, o resultado foi considerado válido. No caso de discrepâncias entre ambos os métodos, o resultado da sequenciação foi considerado válido. No caso de não ser possível efectuar a sequenciação da amostra, as discrepâncias foram analisadas com um *nested* PCR caseiro seguido da sequenciação.

Virus	PneumoVir	
	Sensibilidade	Especificidade
VSR A	100,00	100,00
Parainfluenza 1	88.24	100
Parainfluenza 2	100,00	100,00
Parainfluenza 3	100,00	100,00
Parainfluenza 4	100,00	100,00
Coronavirus	100,00	100,00
Metapneumovirus	86.67	100
VSR B	100,00	100,00
Adenovirus	98,15	99,55
Enterovirus	83.33	100
Influenza A	83.33	99.63
Influenza B	87,50	99,63
Influenza C	100,00	100,00
Rhinovirus	96.55	100
Bocavirus	95	100
Novo H1N1	100,00	100,00
VSR	100,00	100,00

Tabela 2: Sensibilidade e especificidade da técnica **CLART® PneumoVir** para cada tipo de vírus.

11.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Martín-Lázaro J.F., Benito R., González-Domínguez M., and Suárez M. A. "A case of myocarditis mimicking acute coronary syndrome associated with H1N1 influenza A virus infection". *Türk Kardiyo Dern Arş - Arch Turk Soc Cardiol* 2011;39(4):346-350.

Romero-Gomez M.P., Guereta L., Pareja-Grande J. , Martínez-Alarcon J., Casas I., Ruiz-Carrascoso G., Ory F. and Pozo F. "Myocarditis Caused by Human Parainfluenza Virus in an Immunocompetent Child Initially Associated with 2009 Influenza A (H1N1) Virus". *Journal of Clinical Microbiology*, May 2011.

Frobert E., Escuret V., Javouhey E., Casalegno J.S., Bouscambert-Duchamp M., Moulinier C., Gillet Y., Lina B., Floret D., and Morfin F. "Respiratory Viruses in Children Admitted to Hospital Intensive Care Units: Evaluating the CLART1 Pneumovir DNA Array". *Journal of Medical Virology* 83:150–155 (2011).

Renois F., 1,2, Talmud D., Huguenin A., Moutte L., Strady C., Cousson J., Lévêque N. and Andréoletti L. "Rapid Detection of Respiratory Tract Viral infections and Co8 infections in Patients with Influenza-like Illnesses by Use of RT9 PCR DNA Microarray Systems". *Journal of Clinical Microbiology*. August 2010

1. Heyman PVV, Carper HT, Murphy DD, Platss-Mills TA, Patrie J, McLaughlin AP, et al. Viral infections in relation to age, atopic, and season of admission among children hospitalized for wheezing. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114: 239-47.

2. Miguel C, Amela C. Neumonías en España 1982-1992. *Bol Epidemiol Semanal* 1993; 1 (7): 123-9.

3. Donowitz GR, Mandell GL. Neumonía aguda. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (ed.). Principios y práctica de las enfermedades infecciosas. Editorial Médica Panamericana S.A. 4ª ed. Buenos Aires, 1997; 682-702.

4. Organización Panamericana de la Salud. Infecciones respiratorias agudas en la Américas. *Boletín Epidemiológico OPS* 1995; 16(4): 1-5.

5. Knott AM, Long CE, Hall CB. Parainfluenza viral infections in pediatric outpatients: seasonal patterns and clinical characteristics. *Pediatr Infect Dis J*. 1994 Apr; 13 (4): 269-73.

6. Spicuzza L, Spicuzza A, La Rosa M, Polosa R, Di Maria G. New and emerging infectious diseases. *Allergy Asthma Proc*. 2007; 28 (1): 28-34.

7. Boschini A, Longo B, Caselli F, Begnini M, De Maria C, Ansaldi F, Durando P, Icardi G, Rezza G. An outbreak of influenza in a residential drug-rehabilitation community. *J med Virol*. 2006. 78 (9): 1218-22.

8. Herrera GA, Iwane MK, Cortese M, Brown C, Gershman K, Shupe A, Averhoff F, Chaves SS, Gargiullo P, Bridges CB. Influenza vaccine effectiveness among 50-64-year-old persons during a season of poor antigenic match between vaccine and circulating influenza virus strains: Colorado, United States, 2003-2004. Vaccine. 2007 Jan 2;25 (1): 154-60.
9. Hammond S, Chenever E, Durbin JE. Respiratory virus infection in infants and children. Pediatr Dev Pathol. 2007 May-Jun; 10 (3): 172-80.
10. WHO data. 2002.
11. Marta Cruz-Cañete, David Moreno-Pérez, Antonio Jurado-Ortiz, Francisco Jesús García-Martín, Juan López-Siles, Laura Olalla-Martín. Enferm Infecc Microbiol Clin 2007; 25: 177–183.
12. M.A. Marcos, M. Camps, J. Puig de la Bellacasa, T. Pumarola, E. Garcia, J. Mensa, A. Torres y M.T. Jiménez de Anta. Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; 22: 40–46.
13. Vicente D. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. Emerg Infect Dis. 2007 Apr; 13 (4): 636-7.
14. M.L García. Virus respiratorios emergentes. Rev. Patol. Resp, 2007 (10).
15. Gonzalez R, Malone DL, Maselli JM, Sande M.A. Excessive antibiotic use for acute respiratory infections in the United States. Clin Infect Dis. 2001; 33: 757-762.
16. Coiras MT, Aguilar JC, Garcia ML, Casas I, Perez-Brena P. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. J med Virol. 2004 Mar; 72 (3): 484-95.
17. Coiras MT, Perez-Brena P, Garcia ML, Casas I. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. J med Virol. 2003 Jan; 69 (1) :132-44.
- 18.- Elliot, A. J., Cross, K. W., Fleming, D. M. Acute respiratory infections and winter pressures on hospital admissions in England and Wales 1990-2005. J. Public Health. (Oxf.) 30, 91-9
- 19.-Cannon, J. A., Carr. M. J., Yandle, Schaffer. K, Kidnay R., Hosny, G., Doyle, G., Ryan, J., Gunson, R., Collins, T., Carman, W. F., Conell, F., and W. Hall. A low density oligonucleotide microarray for the detection of viral and atypical bacterial respiratory pathogens Journal of Virological Methods
Volume 163, Issue 1, January 2010, Pages 17-24