



**CLART® ENTHERPEX**

**DETECÇÃO E TIPIFICAÇÃO  
DE HERPES E ENTEROVIRUS HUMANO  
ATRAVÉS  
DA IDENTIFICAÇÃO GENÓMICA  
PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO**

## **CLART® ENTHERPEX**

*O conteúdo deste dispositivo encontra-se submetido a Patente Internacional WO2009122201.*

*CLART®, CLART-Strip®, CAR®, SAICLART®, AUTOCLART® e ENTHERPEX® são marcas registadas da GENOMICA*

NB 0318 só diz respeito ao diagnóstico *in vitro* de CMV.



GENOMICA, S.A.U.

Parque Empresarial Alvento, Edificio B

Calle Vía de los Poblados, 1 – 1ª planta

28033 Madrid, Espanha

Telf: +34 91 674 89 90, Fax: +34 91 674 89 91

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

Versão 4  
Julho 2015

## **ÍNDICE:**

- 1. QUADRO DE SÍMBOLOS**
- 2. DESCRIÇÃO DA EMBALAGEM *CLART® ENTHERPEX***
- 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. Zaragatoas**
  - 6.2. Soro, plasma**
  - 6.3. Líquido cefalorraquidiano**
  - 6.4. Tecido embebido em parafina fixado com formol ou etanol**
- 7. PROTOCOLO DE TRABALHO**
  - 7.1. Extracção manual de ADN/ARN a partir de amostras diferentes**
    - 7.1.1. Zaragatoas**
    - 7.1.2. Soro, plasma**
    - 7.1.3. Líquido cefalorraquidiano**
    - 7.1.4. Tecido embebido em parafina fixado em formol ou etanol**
  - 7.2. Extracção automática**
  - 7.3. Reacção de amplificação**
  - 7.4. Visualização do produto amplificado em Array Strips (CS)**
    - 8.4.1 visualização Manaus**
    - 8.4.2. visualização com o autoclart®**
- 8. LEITURA DOS RESULTADOS**

**9. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**

**10. ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS E DE FUNCIONAMENTO**

**11. BIBLIOGRAFIA**

## 1. QUADRO DE SÍMBOLOS



Consulte por favor as instruções de utilização



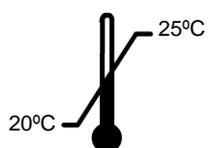
Prazo de Validade



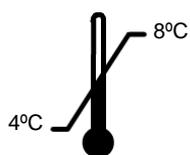
Dispositivo para Diagnóstico *In vitro*



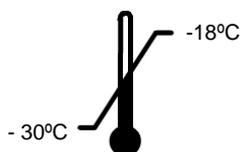
Lote



Conservar à Temperatura Ambiente



Conservar entre 4 °C e 8 °C



Conservar entre – 30 °C e – 18 °C

## **2. DESCRIÇÃO DO DISPOSITIVO CLART® ENTHERPEX**

O dispositivo **CLART® ENTHERPEX** detecta a presença em amostras clínicas (zaragatoas, soro, plasma, líquido cefalorraquidiano e biópsias): HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, EBV, HH6-6, HHV-7 e HHV-8, e dos três vírus mais relevantes do ponto de vista clínico entre a família dos Enterovirus: Poliovirus, Echovirus e Coxsackievirus.

A detecção é efectuada através da **amplificação do fragmento localizado entre 106-328 bp**, cuja sequência está altamente conservada e é suficientemente específica para cada tipo de vírus. Desta forma, estão asseguradas a especificidade e a detecção.

A amplificação dos diferentes tipos de vírus é efectuada em dois diferentes tipos de tubos de RT-PCR (PCR transcriptase reversa). Os tubos MIX 1 são transparentes e utilizam-se para a amplificação e posterior detecção de HSV-1, HSV-2 e VZV. Os tubos MIX-2 de cor verde utilizam-se para a amplificação e visualização dos vírus: CMV, VEB, HHV-6, HHV-7, HHV-8 e Enterovirus (Echovirus, Poliovirus e Coxsackivírus).

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

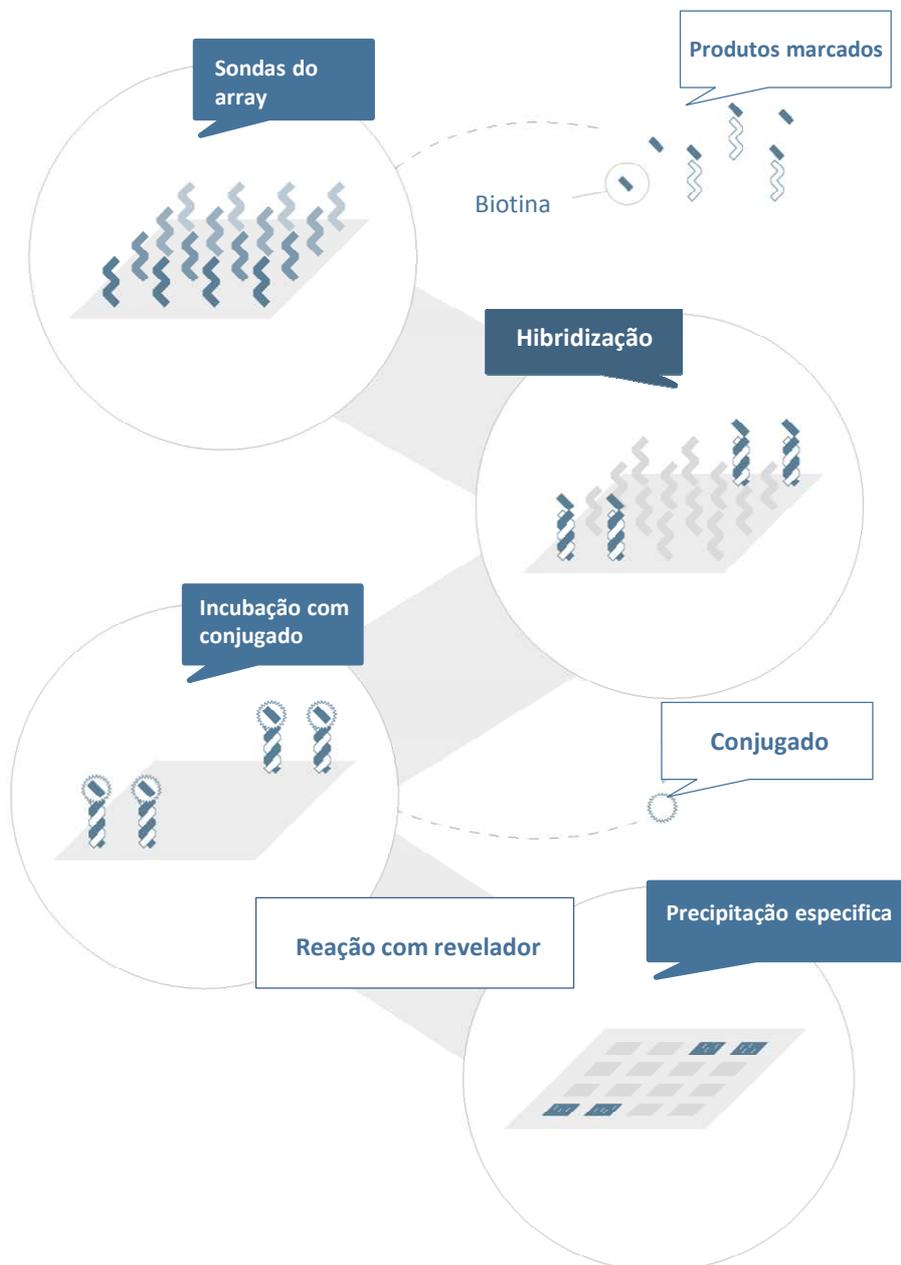


**Figura 1.** Plataforma CLART® no formato de tiras de 8 poços (CS).

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® ENTHERPEX** 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, immobilizadas 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.

A sensibilidade obtida com **CLART® ENTHERPEX**, combinada com a amplificação genómica e com a visualização no micro-array é tão elevada que não é necessário efectuar duplas amplificações (nested-PCR), evitando assim o risco de contaminação.

Um dos principais inconvenientes da detecção por amplificação genética são os falsos negativos, causados principalmente pela presença de inibidores da mistura de enzimas (RT e ADN polimerase) nas amostras nas quais irá ser efectuada a detecção do vírus (hemoglobina, sais, etc.)

Com o dispositivo **CLART® ENTHERPEX** eliminam-se estes falsos negativos graças à adição de um controlo interno da eficiência da reacção de amplificação em cada um dos tubos de amplificação.

Um desempenho incorrecto durante o procedimento de extracção ADN/ARN pode levar a resultados falsos negativos. Recomenda-se especial atenção nesta etapa.

Assim, deve ser incluído um controlo negativo de modo a verificar que as amostras não foram contaminadas durante o processo de extracção, amplificação e visualização; que produziriam resultados falsos positivos.

### **3. COMPONENTES DA EMBALAGEM E CONSERVAÇÃO**

O dispositivo **CLART® ENTHERPEX** contém reagentes suficientes para a extracção e a análise de ADN/ARN de 24 ou 48 amostras clínicas. Os reagentes incluídos na embalagem estão agrupados em várias caixas, dependendo da temperatura na qual se devem conservar. Todos os reagentes são estáveis nas condições indicadas de conservação até ao prazo de validade da embalagem.

#### **3.1. Reagentes de extracção-purificação**

O dispositivo de purificação-extracção **CLART® ENTHERPEX** é expedido a  $-20^{\circ}\text{C}$  e deve ser conservado a esta temperatura até ser utilizado.

Contém os seguintes materiais:

- **SEML** (solução de extracção). **Uma vez descongelado, deve ser conservado a  $4^{\circ}\text{C}$  e utilizado dentro de 8 dias.**
- **SD** (Solução de diluição). Conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou  $4^{\circ}\text{C}$ .

- **IP** (Isopropanol). Conservar a  $-20^{\circ}$  C.
- **DE** (Etanol a 70%). Conservar a  $-20^{\circ}$  C.
- **DB** (Solução de digestão 5X). Uma vez descongelada, conservar a  $4^{\circ}$  C.
- **PK** (Proteinase K 10X). Uma vez descongelada, deve manter-se em gelo e conservar a  $4^{\circ}$  C.

### 3.2. Reagentes de amplificação

São expedidos e conservados a  $-20^{\circ}$  C.

- **Tubos de amplificação**

São expedidos dois tipos de tubos de amplificação

- **Tubo incolor** (multiplex-RT-PCR 1) para a amplificação de HSV-1, HSV-2 e VZV. Contém 45  $\mu$ l de mistura de reacção. Mix 1.
- **Tubo verde** (multiplex-RT-PCR 2) para a amplificação de CMV, VEB, HHV-6, HHV-7, HHV-8 e Enterovirus) (Echovirus, Poliovirus e Coxsackivirus). Contém 43  $\mu$ l de mistura de reacção. Mix 2.

**NOTA:** O tubo de amplificação verde necessita da adição de 2  $\mu$ L de mistura de enzima antes da introdução do material genético extraído. Os tubos incolores já contêm a mistura enzimática.

- **Mistura de enzima:** esta é uma mistura de enzimas **RT** (retrotranscriptase) e **Polimerase ADN**. Pronto a usar. Conservar a  $-20^{\circ}$  C.

**NOTA:** Na embalagem do dispositivo inclui-se um indicador adesivo e irreversível de temperatura; o aparecimento de uma cor vermelha na janela de visualização indica que em algum momento os produtos ultrapassaram a temperatura de conservação de  $-20^{\circ}$  C e não devem utilizar-se.

### 3.3. Reagentes de visualização

São expedidos a  $4^{\circ}$  C. São os seguintes:

- **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 ( $25^{\circ}$ C máx.), protegido da luz.**
- **SH** (Solução de hibridização). **Conservar a  $4^{\circ}$  C.**
- **DC** (Diluyente do conjugado). **Conservar a  $4^{\circ}$  C.**
- **CJ** (Conjugado). **Conservar a  $4^{\circ}$  C.** Centrifugar antes de utilizar.
- **RE** (Solução de desenvolvimento). **Conservar a  $4^{\circ}$  C.**
- **TL** (Tampão de lavado). **Conservar a  $4^{\circ}$  C.**

**ADVERTÊNCIA!** Após receber a embalagem, os micro-arrays devem ser conservadas à temperatura ambiente.

### **3.4. Outros componentes**

A técnica requer um sistema para capturar e processar a imagem obtida do micro-array, criando de modo totalmente automatizado um relatório único para cada amostra analisada. O quadro a seguir apresenta as características do sistema da GENOMICA. Tem um **Software específico para CLART® ENTHERPEX**, designado e validado por GENOMICA.

- **Leitor CAR®:** CLINICAL ARRAY READER)( figura 3) :que permite a leitura e interpretação automática até 12 CS, o que significa, um total de 96 amostras. Esta plataforma é fabricada exclusivamente para os dispositivos da GENOMICA.
- **SAICLART®:** software desenvolvido e validado pela GENOMICA para processamento de imagens.
- **Software:** específico para **CLART® ENTHERPEX**, designado e validado por GENOMICA. Instalado e pronto a usar.



**Figura 3.** CAR® (CLINICAL ARRAY READER)

## **4. MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS**

Encontra-se abaixo a lista de materiais necessários mas não fornecidos.

### **4.1. 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

#### 4.2. 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.

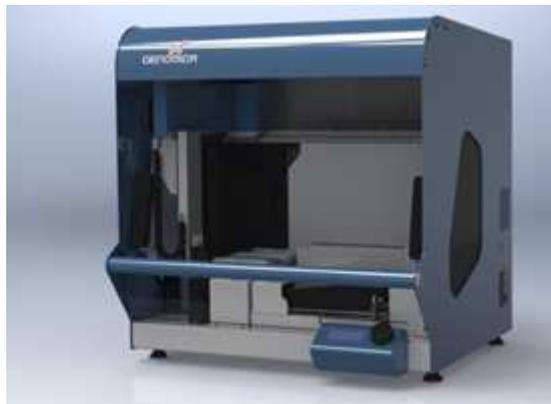


Figura 4. autoclart®

- Microcentrifuga
- Termociclador
- Câmara de biosegurança para o laboratório de extracção
- Três micropipetas ajustáveis entre 1-20  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$  e 200 – 1000  $\mu\text{L}$  para laboratório de extracção.
- Uma micropipeta ajustável entre 1-20  $\mu\text{L}$  para adicionar a mistura de enzimas ao tubo de cor de amplificação e para adicionar o material genético aos tubos de amplificação.
- Três micropipetas ajustáveis entre 1-20  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ , e 200 – 1000  $\mu\text{L}$  para o laboratório de visualização.
- Bloco de aquecimento com agitação; ajustável a 25° C, 30° C, 50° C e 53° C. Compatível com tubos do tipo Eppendorf e com tiras de 8 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 duas 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, grades, luvas, etc.) que nunca devem ser utilizadas fora destas áreas.

- **Área Pre-PCR:** nesta área, é efectuada a extracção de ADN/ARN, a mistura de enzimas é adicionada aos tubos de amplificação e ADN/ARN é adicionado aos tubos de amplificação. Deve ser utilizada uma câmara de fluxo laminar.
- **Área Pós-PCR:** nesta área é efectuada a amplificação e visualização do produto amplificado. O material desta área nunca deve entrar em contacto com a área de extracção. Evitar ir para a área de pre-PCR após ter estado a trabalhar na área de visualização.

2. **Utilizar sempre luvas.** É aconselhado substituir de luvas com uma determinada frequência e obrigatoriamente cada vez que começar a trabalhar nas áreas anteriormente descritas. As novas luvas 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, grelhas, pipetas e termociclador) em profundidade com lixívia diluída a 10% **a seguir a cada processamento de amostras**; e obrigatoriamente desinfectar as áreas de trabalho em caso de contaminação. Utilizar um novo filtro de papel de cada vez que comece a trabalhar. É aconselhado limpar o termociclador e o bloco de aquecimento com lixívia diluída a 10%.

4. **Utilizar sempre pontas com filtro ou pipetas de deslocação positivas** para evitar contaminação devida a micropipetas. Deve ser utilizado um conjunto de pipetas em cada área.

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. **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 com 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 da tira, 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 do microarray 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 microarray 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. Zaragatoas**

Colher a amostra com uma zaragatoa seca e estéril, de algodão ou de alginato, preferencialmente, do tipo uretral (incluindo para o esfregaço vaginal). Não utilizar dispositivos que produzam sangramento da lesão. Reintroduzir a zaragatoa no seu tubo sem utilizar qualquer outro tipo de meio. Conservar a amostra a 4º C se tiver de ser processada dentro de 7 dias ou a –20º C se tiver de ser processada mais tarde.

### **6.2. Soro ou plasma**

As amostras de sangue cujo plasma será extraído devem ser colhidas em tubos que contêm citrato ou EDTA como anticoagulante, nunca heparina.

De modo a extrair soro, permitir que a amostra de sangue coagule durante 30 minutos e depois centrifugar a 1500 r durante 20 min.

Em alguns casos, a seguir à colheita de amostras deste tipo, é possível isolar a fracção celular e proceder à extracção de ADN/ARN a partir desta.

Se a amostra for processada dentro de 12 horas, deve ser conservada a 4º C. Se a análise for processada após esse prazo, a amostra deve ser conservada aliquoteada a –70º C e só deve ser descongelada antes de efectuar o seu processamento. É importante evitar congelações e descongelações sucessivas.

### **6.3. Líquido cefalorraquidiano**

Se a amostra for processada dentro de 12 horas, deve ser conservada a 4º C. Se pretender efectuar a análise posteriormente, a amostra deve ser conservada aliquoteada a –70º C e descongelada apenas na altura do processamento. É importante evitar as congelações e descongelações sucessivas.

### **6.4. Biópsias embebidas em parafina e fixadas com formol ou etanol**

Fixar amostras em formol tamponado pelo tempo mais curto possível (nunca mais de 24 horas), para evitar a degradação de ADN/ARN. Utilizar formol não tamponado ou uma fixação por mais de 24 h poderá conduzir a um resultado falso negativo.

É **importante** limpar cuidadosamente a lâmina com xileno ou utilizar lâminas descartáveis, antes e depois de cortar a amostra, para evitar a transferência de resíduos de um corte prévio da amostra. Utilizar um microtomo para cortar 2-3 cortes de 5 µm e colocá-los num tubo estéril de 1,5 ml.

## **7. PROTOCOLO DE TRABALHO**

## 7.1. Extracção manual de ADN/ARN de várias amostras

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

### ***Recomendações específicas antes de iniciar a extracção:***

- Trabalhar na área de extracção pre-PCR, utilizando sempre uma câmara e seguindo as recomendações mencionadas na secção 6.1.
- Antes de iniciar e ao finalizar, deve limpar-se muito bem a área da câmara com lixívia diluída a 10%.
- Limpar as pipetas antes e depois de cada utilização com lixívia diluída a 10%.
- Manter as amostras em gelo.
- Utilizar tubos Eppendorf de 1,5 ml estéreis. Mantê-los o mais separados possível na grelha durante a extracção de forma a evitar a contaminação.

### **Extracção ADN/ARN**

#### **7.1.1. Zaragatoas**

No final de cada série de amostras incluir um controlo negativo constituído por 1,5 ml de solução salina e processar como o resto das amostras.

1. Adicionar 1,5 ml de solução salina (0,9% de cloreto de sódio) ao tubo que contém a zaragatoa e agitar em vortex durante 1 minuto.
2. Decantar o sobrenadante num tubo Eppendorf de 1,5 ml autoclavado e centrifugar durante 10 minutos numa microcentrífuga na velocidade máxima.
3. Remover o sobrenadante com a pipeta tendo muito cuidado para não derramar o precipitado de células.
4. Descongelar um tubo de **DB 5X** (Solução de Digestão 5X), um tubo de **PK 10X** (Proteinase K 10X) e um tubo **SD** (Solução de Diluição). *A Proteinase K deve manter-se em gelose enquanto estiver a ser utilizada, depois deve ser conservada a 4º C, mantendo-se estável durante 7 dias. Após descongelada, não deve ser congelada novamente.* Preparar a mistura de digestão, misturando as seguintes quantidades por cada amostra a analisar:

$$70 \times (\text{n}^\circ \text{ tubos} + 1) = \text{_____} \mu\text{l de SD (Solução de Diluição)}.$$

$$20 \times (\text{n}^\circ \text{ tubos} + 1) = \text{_____} \mu\text{l de DB5X ( Solução de Digestão 5X)}.$$

$$10 \times (\text{n}^\circ \text{ tubos} + 1) = \text{_____} \mu\text{l de PK 10X (Proteinase K 10X)}.$$

5. Adicionar 100 μl de mistura de digestão a cada amostra. Suspende de novo suavemente o precipitado de células com a ajuda da micropipeta.
6. Incubar a 55º-60º C durante 2 h.
7. Ferver durante 10 minutos para inactivar a Proteinase K. Se os tubos não estiverem correctamente fechados, aconselha-se a perfurar os tampões com uma agulha para

impedir que se abram durante a incubação a 100° C. Evitar que a água do banho-maria entre no tubo através desta perfuração. Não fechar a tampa do banho-maria.

8. Centrifugar numa microcentrífuga à velocidade máxima durante 10 minutos. Passar imediatamente o sobrenadante para um tubo limpo e aliquotar 5 µl para efectuar uma reacção de amplificação. Conservar o remanescente a – 20° C.

### **7.1.2 Soro ou plasma**

É necessário efectuar uma amostra formada por 100 µl de solução salina e que servirá de controlo negativo da reacção de amplificação e visualização.

1. Descongelar a amostra e mantê-la no gelo.
2. Colocar 100 µl de amostra clínica num tubo Eppendorf de 1,5 mL.
3. Adicionar 400 µl de SEML (solução de extracção de amostra líquida). Esperar que a solução descongele e que fique transparente antes de utilizá-la. Misturar invertendo os tubos várias vezes e incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente.
4. Adicionar 500 µl de isopropanol (conservado a – 20° C), e manter no gelo até ser utilizado. Misturar invertendo os tubos várias vezes e centrifugar, preferencialmente a 4° C, a 13000 rpm durante 20 minutos.
5. Pipetar o sobrenadante utilizando uma micropipeta. Uma micropipeta de 1000 µl pode ser utilizada para eliminar o sobrenadante, no final pode utilizar-se uma pequena micropipeta, por exemplo de 20 µl para remover os resíduos no fundo do tubo sem remover acidentalmente o precipitado.
6. Adicionar 500 µl de Etanol a 70% (conservado a – 20° C), e mantê-lo no gelo até ser utilizado. Agitar suavemente para limpar o precipitado do fundo e centrifugar durante 15 min. a 13000 rpm.
7. Eliminar o sobrenadante cuidadosamente como se indica no ponto 5. Secar perfeitamente na câmara durante 15 ou 20 minutos com os tubos abertos. Antes de suspender novamente a amostra, confirmar que não há resíduos de etanol que possam inibir o PCR.
8. Suspender de novo em 25 µl de Solução de diluição. O ADN/ARN extraído pode utilizar-se directamente para a sua análise (irá manter-se no gelo até adicioná-lo ao tubo de amplificação) ou pode conservar-se a –20° C.

### **7.1.3. Líquido cefalorraquidiano**

É necessário processar uma amostra que consiste em 50 µl de solução salina e que servirá como controlo negativo da reacção de amplificação e visualização.

1. Descongelar as amostras em gelo.
2. Colocar 100 µl da amostra clínica num tubo de 1,5 mL do tubo Eppendorf.
3. Adicionar 400 µl de SEML (solução de extracção de amostra líquida). Esperar até que a solução descongele e que fique transparente antes de utilizá-la. Misturar invertendo os tubos várias vezes e incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente.
4. Adicionar 500 µl de isopropanol (conservado a – 20° C), e manter no gelo até ser utilizado. Misturar invertendo os tubos várias vezes e centrifugar, preferencialmente a 4° C, a 13000 rpm durante 20 minutos.

5. Pipetar o sobrenadante utilizando uma micropipeta. Uma micropipeta de 1000 µl pode ser utilizada para eliminar o sobrenadante, no final pode utilizar-se uma pequena micropipeta, por exemplo de 20 µl para remover os resíduos no fundo do tubo sem remover acidentalmente o precipitado.
6. Adicionar 500 µl de Etanol a 70% (conservado a – 20º C), e mantê-lo no gelo até ser utilizado. Agitar suavemente para limpar o precipitado do fundo e centrifugar durante 15 min. a 13000 rpm.
7. Eliminar o sobrenadante cuidadosamente como se indica no ponto 5. Secar perfeitamente na câmara durante 15 ou 20 minutos com os tubos abertos. Antes de suspender novamente a amostra, confirmar que não há resíduos de etanol que possam inibir o PCR.
8. Suspender de novo em 25 µl de Solução de diluição. O ADN/ARN extraído pode utilizar-se directamente para a sua análise (irá manter-se no gelo até adicioná-lo ao tubo de amplificação) ou pode conservar-se a –20º C.

#### **7.1.4. Biópsias fixadas com formol ou etanol e incluídas em parafina**

1.A. **Incluídas em parafina:** Efectuar com o microtomo 2 cortes de 5 µl e colocá-los num tubo Eppendorf de 1,5 ml autoclavado. É importante limpar cuidadosamente a lâmina com xileno, antes e depois de cortar a amostra, para evitar a contaminação de uma amostra anterior para a presente.

1.B. **Fixadas com formol ou etanol:** Cortar/esmagar um fragmento de amostra de 2-3- ml com uma lâmina limpa numa superfície limpa e introduzi-la num tubo limpo de 1,5 mL. Esmagar o tecido com a ponta da pipeta, misturar no vortex para facilitar a lise.

2. Descongelar o tubo **DB 5X** (Solução de Digestão 5X), um tubo de **PK 10X** (Proteinase K 10X) e o tubo de **SD** (Solução de Diluição) à temperatura ambiente. *A Proteinase K deve manter-se no gelo enquanto estiver a ser utilizada, e depois deve ser mantida a 4º C; nunca voltar a congelar depois de descongelada.* Preparar uma mistura de digestão, misturar as seguintes quantidades por cada amostra a analisar:

70 x (nº tubos + 1) = \_\_\_ µl de **SD** (Solução de Diluição)

20 x (nº tubos + 1) = \_\_\_ µl de **DB5X** (Solução de Digestão 5X)

10 x (nº tubos + 1) = \_\_\_ µl de **PK 10X** (Proteinase K 10X)

Adicionar 100 µl de mistura de digestão a cada amostra. Empurrar o corte com a ponta da micropipeta para que possa ser completamente coberta pela mistura de digestão.

Adicionar 100 µl de mistura a um tubo de 1,5 mL vazio, que irá ser processado como controlo negativo de extracção e visualização.

3. Incubar num bloco de aquecimento ou num banho-maria a 56º C durante 3 horas.

4. Deixar ferver durante 10 minutos para inactivar a Proteinase K. Se o fecho dos tubos não for suficientemente forte, aconselha-se a perfurar as tampas com uma agulha de modo a prevenir que se abram durante a incubação a 100° C.

5. Centrifugar imediatamente numa microcentrífuga durante 10 minutos. Colher o sobrenadante num tubo de 1,5 ml limpo, atravessando com uma micropipeta a capa superior de parafina solidificada. O ADN extraído pode ser analisado directamente ou pode ser conservado a – 20° C.

## **7.2. Extracção automática**

Seguir as recomendações do fabricante.

## **7.3. Reacção da amplificação**

### **7.3.1. Recomendações específicas para a amplificação**

- Trabalhar na área de Pre-PCR, numa câmara seguindo as recomendações mencionadas em 6.1.
- Ter especial cuidado aquando da adição da mistura de enzimas aos tubos de amplificação, já que contêm uma elevada percentagem de glicerol. Se introduz 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 produto suficiente para o resto dos tubos de amplificação do dispositivo.
- Adicionar o ADN/ARN à **área de Pre-PCR**, utilizando sempre uma câmara e seguindo as recomendações mencionadas no ponto 6.1. Durante o procedimento, manter os tubos fechados, separados e no gelo.

### **7.3.2. Protocolo de Reacção de Amplificação**

1. Para cada amostra a ser processada, descongelar os **Tubos de amplificação** (um incolor e outro verde) e mantê-los no gelo. Não usar temperaturas acima de 37° C para a descongelação.
2. Centrifugar uns segundos na microcentrífuga para que o líquido vá para o fundo do tubo. No caso de não haver adaptadores de microcentrífuga, podem utilizar-se em substituição tubos maiores, depois de ter retirado a tampa.
3. **Adicionar 2 µL de mistura enzimática ao tubo de amplificação verde** (Mix 2). Manter a mistura enzimática no gelo durante a manipulação.
4. Adicionar 5 µl de ARN/ADN extraído das amostras 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 para ambos tipos de multiplex:

1 ciclo	45° C 45 minutos
	95° C 15 minutos
45 ciclos	95° C 30 segundos
	56° C 90 segundos
	72° C 60 segundos
1 ciclo	72° C 10 min.
4° C continuamente até à colheita dos tubos (opcional)	

6. Iniciar o programa e colocar os **Tubos de Reacção** no termociclador. A amplificação leva cerca de 5 horas, mas pode variar ligeiramente dependendo do tipo de sistema utilizado.

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

##### ***Recomendações específicas antes de iniciar a visualização:***

1. Ao iniciar o processo. A auto-calibração do sistema pode levar alguns minutos e deve ficar pronto para a leitura de modo a evitar perda de tempo desnecessária que pode levar a um excesso de revelação do produto.
2. PREPARAR A SOLUÇÃO DE LAVAGEM ANTES DE CADA ANÁLISE, NÃO REUTILIZAR SOLUÇÕES OU RESTOS PREPARADOS ANTERIORMENTE.
3. Limpar o termociclador com solução de lixívia diluída a 10% antes de iniciar o programa de desnaturalização. É recomendado limpar cada poço com lixívia diluída utilizando uma zaragatoa. Colocar os tubos de amplificação no termociclador tão separados quanto possível durante a desnaturalização e nunca ultrapassar os 10 minutos.
4. Não são necessárias pontas com filtro durante as etapas de visualização. Substituir sempre as pipetas Pasteur utilizadas para a aspiração na bomba de vácuo obrigatoriamente após terminar uma análise e de cada vez que se aspire uma nova amostra após a etapa de hibridização. Esta precaução também deve ser efectuada para o tampão TL.
5. 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.
6. **Todos os tampões devem ser completamente aspirados dos poços sem tocar no fundo.**
7. Deixar a SH (solução de hibridização) atingir a temperatura ambiente até o precipitado de cristais desaparecer completamente.

8. Assegurar-se de que, antes de iniciar a hibridização, a temperatura do termomixer atingiu os 59° C durante, pelo menos, 1 hora.
9. Colocar imediatamente a tira no Thermomixer após a adição de SH (Solução de Hibridização).
10. Ao executar um grande número de tiras, é aconselhado utilizar pipetas multicanal. Definir um recipiente específico para cada reagente e limpar com lixívia diluída a 10% após utilização.

#### **7.4.1. Visualização manual**

1. Desnaturação: utilizar o termociclador para desnaturar os produtos amplificados. Para esta etapa, colocar os tubos no termociclador e incubar a 95° C durante 10 minutos. Programar 15 minutos no termociclador para que após 10 minutos os produtos amplificados possam continuar a 95° C. Remover os tubos da incubação a 95° C e colocá-los imediatamente num recipiente com 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 CS: Antes de iniciar a análise, é necessário efetuar uma pré-lavagem das CS, adicionando 200 µl de Solução TL diluída a cada array e homogeneizar 10 a 15 vezes com a ajuda da pipeta, evitando tocar na superfície da Strip. Eliminar a Solução TL diluída utilizando uma pipeta ou preferencialmente um sistema de vácuo.

Esta etapa torna-se necessária para lavar os poços, antes de adicionar a amostra. Os poços não devem conter resíduos de solução de lavagem. Em nenhuma circunstância, os poços devem ficar secos durante um longo período de tempo.

4. Hibridização: Deixar a SH (solução de hibridização) atingir a temperatura ambiente até o precipitado de cristais desaparecer completamente. Uma vez desnaturados os produtos PCR, adicionar 100 µl de Solução SH (à temperatura ambiente) a cada poço, evitar que se forme espuma. Adicionar 5 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, evitando tocar na superfície da Strip. Os poços não devem conter resíduos. Em nenhuma circunstância, os poços devem ficar secos durante um longo

período de tempo. 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.

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 8.

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.  
**Os poços não devem conter resíduos .Se esta lavagem não for efectuada rapidamente, pode causar sinais ilegíveis durante a leitura.**
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. Ler no CAR®. Colocar a Strip no CAR®, este irá analisar os *Arrays* automaticamente.

#### **7.4.2. A visualização com o autoclart®**

Desnaturação: utilizar o termociclador para desnaturar os produtos amplificados. Para esta etapa, colocar os tubos no termociclador e incubar a 95° C durante 10 minutos. Programar 15 minutos no termociclador para que após 10 minutos os produtos amplificados possam continuar a 95° C. Remover os tubos da incubação a 95° C e colocá-los imediatamente num recipiente com gelo.

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 **ENTHERPEX 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.

**ADVERTÊNCIA!** Recomenda-se que cada ml deve ser preparado da seguinte forma: 1000 µl de DC (Diluyente do Conjugado) e 5 µl de reagente CJ. uma vez que um aumento da concentração de conjugado pode causar falsos positivos.

**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®.

**ADVERTÊNCIA! deve proceder imediatamente à leitura dos resultados do CAR®, caso contrário podem ocorrer falsos negativos devido à perda de intensidade das sondas.**

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; a coluna da esquerda apresenta o vírus caracterizado no micro-array. A coluna central apresenta um resultado positivo ou negativo em cada vírus, enquanto a da direita apresenta a validade determinada pelo controlo de amplificação.

## 9. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Um dos inconvenientes da detecção por amplificação genómica são os falsos negativos devidos fundamentalmente a presença de inibidores de ADN polimerase nas amostras nas quais se quer analisar a presença do vírus (hemoglobina, restos de parafina, sais, etc.). Com o dispositivo **CLART® ENTHERPEX** eliminaram-se os falsos negativos graças à introdução de um controlo interno de amplificação em ambos os tubos de reacção onde se analisa a amostra.

Cada tubo de amplificação contém os seguintes oligonucleotidos:

- Oligonucleotidos que amplificam um plasma modificado incluído no tubo de amplificação e que se utilizam como controlo de amplificação da reacção RT-PCR.
- Oligonucleotidos específicos de vírus de Herpes e Enterovirus.

O tubo RT-PCR foi concebido para favorecer a amplificação do vírus mais do que o controlo de amplificação. De modo que, em determinadas condições (por exemplo, quando existe um elevado número de cópias de um vírus ou quando a amostra apresenta co-infecções com vários vírus ao mesmo tempo) alguns controlos podem não ser amplificados e pode aparecer a seguinte leitura: **CONFORME**.

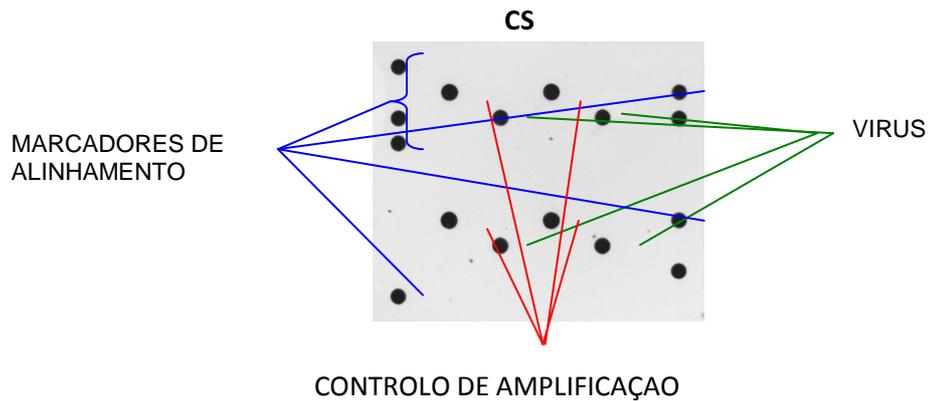
A razão desta concepção é que **o controlo interno de amplificação** irá permitir distinguir os casos de inibição de reacção de PCR dos que não foi detectado o ADN da amostra. Tendo em conta estas observações, podemos considerar as seguintes interpretações dos resultados de leitura:

**1. Amostras positivas:**

1.1. Com controlo de amplificação positivo

Vírus	Resultado	Controlo
Espécie	Positivo	Conforme

Controlo	Sinal	Resultado
Controlo interno	> 0.150	Conforme

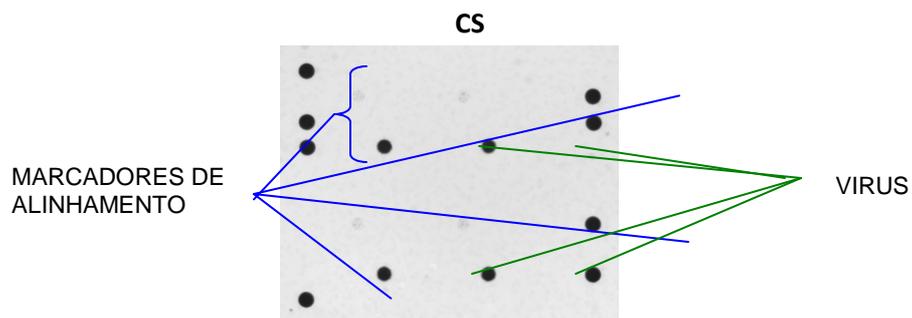


Este considera-se um **RESULTADO VÁLIDO**. Pode decidir-se que se trata de um **verdadeiro resultado positivo**.

1.2. Com controlo de amplificação negativo

Vírus	Resultado	Controlo
Espécie	Positivo	Conforme

Controlo	Sinal	Resultado
Controlo interno	< 0.150	Sem sinal

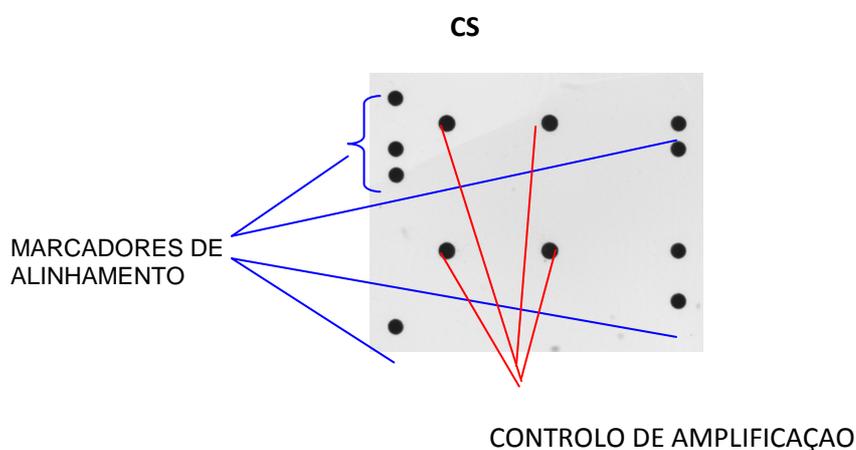


Este considera-se um **RESULTADO VÁLIDO**, mesmo se o controlo de amplificação se mostrar SEM SINAL. Tal é devido ao efeito de competição do vírus. Pode considerar-se um **resultado positivo verdadeiro**.

## 2. Amostras negativas

Vírus	Resultado	Controlo
Espécie	Negativo	Válido

Controlo	Sinal	Resultado
Controlo interno	> 0.150	Válido

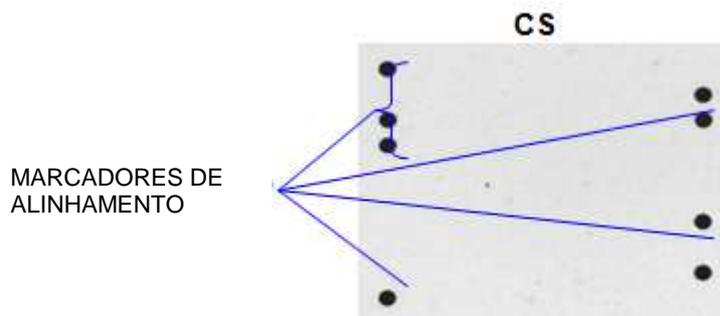


Este é considerado um **RESULTADO VÁLIDO**. Neste caso pode dizer-se que se tratar de um **resultado negativo verdadeiro**.

### 1. Amostras inibidas, inadequadas

Vírus	Resultado	Controlo
Espécie	Negativo	PCR inibido

Controlo	Sinal	Resultado
Controlo interno	> 0.150	Sem sinal



Este é considerado um **RESULTADO INVÁLIDO**. Isto deve-se a que algumas substâncias podem ter inibido a reacção de PCR ao prejudicar a actividade da enzima ADN polimerase.

A solução é verificar que não há substâncias deste tipo na amostra ou que no material genético extraído não há presença de nenhuma destas substâncias. Recomenda-se repetir a extracção ou, se não for possível, pedir ao médico uma nova amostra do doente.

Há duas possibilidades que levam a um resultado **Não Conclusivo de Vírus**:

- Nos casos em que três cópias de uma sonda são muito diferentes umas das outras
- Em co-infecções para aqueles vírus que se encontram no limite da detecção da técnica.

## 10. ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS E DE FUNCIONAMENTO

### Controlo de interferências conhecidas:

Existem substâncias que podem interferir com o funcionamento do dispositivo **CLART® ENTHERPEX**. Tratam-se de substâncias que, principalmente, inibem a mistura de enzimas e, portanto, a reacção de amplificação. As interferências mais conhecidas são:

1. **Presença de hemoglobina ou parafina a seguir à extracção de ADN/ARN.** Tanto o ADN extraído a partir de amostras de sangue total ou de outros produtos de sangue, como o obtido a partir de amostras de tecido incluídos em parafina, pode conter restos de hemoglobina e parafina respectivamente. Este problema pode ser evitado purificando o ADN/ARN a seguir à extracção.
2. **Resíduos de Isopropanol no ADN/ARN.** No processo de extracção do ADN/ARN a partir de amostras de soro, plasma e LCR, tem de ser precipitado com isopropanol. Se o precipitado não secar correctamente, a presença de isopropanol na amostra pode inibir a reacção de amplificação.
3. **Utilização inadequada de amostras.** A análise de qualquer tipo de amostras clínicas outras que não as especificadas no manual do dispositivo **CLART® ENTHERPEX**, ou uma colheita de amostras incorrecta, pode produzir que o resultado da análise não seja

conclusivo ou não conforme por falta de amplificação por reacção inibida. Por exemplo, se a zaragatoa tiver sido incluída em qualquer tipo de meio, tal pode resultar na inibição da PCR. Se o tempo de fixação de um tecido em formol for excessivo, o ADN pode degradar-se.

4. **Actividade residual da Proteinase K.** No processo de extracção de ADN/ARN em amostras de zaragatoas e biópsias, tem de inactivar-se a Proteinase K mediante incubação a 100º C durante 10 minutos. Nestas condições, a inactivação é completamente efectuada. Se esta etapa for omitida, ou as condições não forem respeitadas exactamente como especificado, poderá haver actividade residual da proteinase K que pode causar degradação do ADN polimerase, levando assim à inibição da PCR.
5. **Conservação inadequada das amostras** pode influenciar o resultado da análise, se as amostras forem sujeitas a condições que podem resultar na degradação do seu ADN/ARN.

#### Especificações técnicas:

##### 1. Parâmetros analíticos:

- **Sensibilidade analítica.** A sensibilidade analítica dos tipos de vírus apresentados na tabela 1 foi determinada através da amplificação de séries de diluições de ADN de plasmídeos recombinantes para cada um dos vírus detectados com o dispositivo. Cada um deles contém o produto de amplificado inserido (incluindo a parte complementar da sonda específica de detecção). A etapa de visualização, foi desenvolvida para toda a plataforma CLART® CS, obtendo os mesmos resultados que estão descritos na tabela abaixo.

VIRUS	Nº de cópias de plasmídeo por reacção de PCR.
VZV	10
HHV-7	
HSV-1	
HSV-2	100
CMV	
EBV	
HHV-6	
HHV-8	
Coxsackivirus	1000
Echovirus	
Poliovirus	

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

- **Especificidade analítica.** Foram efectuadas experiências de especificidade com plasmídeos recombinantes. Os resultados estão resumidos na tabela 2.

VIRUS	ESPECIFICIDADE ANALÍTICA
HSV-1	100 %
VZV	
CMV	
HHV-6	
HHV-7	
HHV-8	
HSV-2	99.4 %
EBV	92.2 %
Enterovirus	

**Tabela 2:** Sensibilidade analítica por tipo vírico

## 2. Parâmetros de utilidade de diagnóstico

Para determinar os parâmetros diagnósticos do dispositivo, realizaram-se estudos comparativos da técnica **CLART<sup>®</sup> ENTHERPEX** em relação às seguintes técnicas:

- Herplex<sup>®</sup>: para os vírus HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, VEB, e HHV-6
- PCR quantitativo: em alguns casos, para CMV e VEB
- PCR em tempo real: para Enterovirus
- PCR de desenvolvimento próprio e detecção em gel: para vírus HHV-7 e HHV-8.
- Imunohistoquímica para HHV-8.

Resultados da análise das amostras estudadas resumidos no quadro a seguir:

VIRUS	Amostras Positivas	Amostras Negativas	Total	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
<b>HSV-1</b>					
Zaragatoas	16	14	30	100	100
Soro/Plasma	4	52	56	75	100
LCR	7	12	19	57.1	100
Biópsia	8	60	68	87.5	100
<i>Total</i>	<i>35</i>	<i>138</i>	<i>173</i>		
<b>HSV-2</b>					
Zaragatoas	4	26	30	75	100
Soro/Plasma	0	56	56	--	--

LCR	0	19	19	--	--
Biópsia	4	64	68	100	100
<i>Total</i>	8	165	173		
<b>VZV</b>					
Zaragatoas	3	27	30	100	100
Soro/Plasma	1	55	56	100	100
LCR	2	17	19	100	94.1
Biópsia	4	64	68	100	95.3
<i>Total</i>	10	163	173		
<b>CMV</b>					
Zaragatoas	2	28	30	50	100
Soro/Plasma	47	9	56	87.2	100
LCR	8	11	19	62.5	100
Biópsia	41	27	68	95.1	100
<i>Total</i>	98	75	173		
<b>EBV</b>					
Zaragatoas	6	24	30	100	100
Soro/Plasma	2	54	56	100	98.1
LCR	2	17	19	100	94.1
Biópsia	38	30	68	94.7	93.3
<i>Total</i>	48	125	173		
<b>HHV-6</b>					
Zaragatoas	9	47	56	77.8	100
Soro/Plasma	0	30	30	--	--
LCR	3	16	19	33.3	100
Biópsia	23	45	68	91.3	100
<i>Total</i>	35	138	173		
<b>HHV-7</b>					
Zaragatoas	3	27	30	100	100
Soro/Plasma	2	54	56	100	100
LCR	1	18	19	100	100
Biópsia	11	57	68	100	100
<i>Total</i>	17	156	173		
<b>HHV-8</b>					
Zaragatoas	0	30	30	--	--
Soro/Plasma	0	19	19	--	--
LCR	3	53	56	100	100
Biópsia	2	66	68	100	100
<i>Total</i>	5	168	173		
<b>ENTEROVIRUS</b>					
Zaragatoas	0	56	56	--	--
Soro/Plasma	0	68	68	--	--
LCR	0	30	30	--	--
Biópsia	10	9	19	80	100
<i>Total</i>	10	163	173		

**Tabela 3:** Parâmetros de diagnóstico da técnica **CLART® ENTHERPEX**

Foram amplificadas 126 amostras para validar a nova plataforma CLART-Strip®. Estas amostras foram testadas comparativamente entre a plataforma CLART-Strip® e a plataforma Array Strip (AS), que está a ser substituída. A plataforma Array Strip (AS) foi validada previamente com a plataforma Array Tubes (AT). Os seguintes tipos virais foram utilizados para a validação como demonstrado abaixo:

<b>N = 120</b>	<b>Número de amostras analisadas</b>	<b>Resultados AS Versão 8.0</b>	<b>Resultados CS Versão 8sc.0</b>
<b>HSV1</b>	24	24	24
<b>HSV2</b>	36	36	36
<b>VZV</b>	24	24	24
<b>CMV</b>	30	30	30
<b>EBV</b>	28	28	28
<b>HHV6</b>	24	24	24
<b>HHV7</b>	24	24	24
<b>HHV8</b>	31	31	31
<b>ENTEROVIRUS</b>	24	24	24
<b>NEGATIVAS</b>	6	6	6

**QUADRO 4. AMOSTRAS ANALISADAS PARA O ESTUDO COMPARATIVO DE AS/CS.**

As concordâncias entre as plataformas são de 100%, o que não altera os parâmetros de diagnóstico descritos anteriormente.

## **11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Tsan-Chi Chen, Guang-Wu Chen, Chao Agnes Hsiung, Jyh-Yuan Yang, Shin-Ru Shih, Yiu-Kay Lai, Jyh-Lyh Juang: "Combining Multiplex Reverse Transcription-PCR and a Diagnostic Microarray to Detect and Differentiate Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16". *Journal of Clinical Microbiology*. 44(6), 2212-2219 (2006).
2. Boriskin YS, Rice PS, Stabler RA, Hinds J, Al-Ghusein H, Vass K, Butcher PD.: "DNA microarrays for virus detection in cases of central nervous system infection" . *Journal of Clinical Microbiology*. 42(12), 5811-5818 (2004).
3. Jaaskelainen AJ, Piiparinen H, Lappalainen M, Koskiniemi M, Vaheri A.: "Multiplex-PCR and oligonucleotide microarray for detection of eight different herpesviruses from clinical specimens". *Journal of Clinical Virology*, 37(2), 83-90 (2006)
4. Coiras MT, Aguilar JC, García ML, Casas I, Pérez-Breña P.: "Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription

- nested-PCR assays". *Journal Medical Virology* , 72(3), 484-495 (2004).
5. Zheng ZB, Wu YD, Yu XL, Shang SQ.: "DNA microarray technology for simultaneous detection and species identification of seven human herpes viruses". *Journal Medical Virology*, 80(6), 1042-1050 (2008).
  6. Hudnall SD, Chen T, Allison P, Tying SK, Heath A.: "Herpesvirus prevalence and viral load in healthy blood donors by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Transfusion*, Apr 15 (2208).
  7. Afenjar A, Rodriguez D, Rozenberg F, Dorison N, Guët A, Mignot C, Doummar D, Billette de Villemeur T, Ponsot G.: "Human herpes virus type 6, etiology of an acute encephalitis in childhood: case report". *Arch Pediatric*, 14(5), 472-475 (2007).
  8. Zambrano Y, Chiarello A, Soca A, Villalobos I, Marreno M, Soler M, Laferte J, Alvarez M."Use of polymerase chain reaction for the diagnosis of central nervous system infections". *Invest Clin.*, 47(4),337-347 (2206).
  9. Huang C, Morse D, Slater B, Anand M, Tobin E, Smith P, Dupuis M, Hull R, Ferrera R, Rosen B, Grady L. "Multiple-year experience in the diagnosis of viral central nervous system infections with a panel of polymerase chain reaction assays for detection of 11 viruses.". *Clin Infect Dis.*, 39(5), 630-635 (2004).
  10. Casas I, Pozo F, Trallero G, Echevarría JM, Tenorio A. "Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for entero- and herpesviruses in a prospective study". *Journal Medical Virology* 57(2), 145-151 (1999).
  11. Kanerva M, Jääskeläinen AJ, Suvela M, Piiparinen H, Vaheri A, Pitkäranta A. "Human herpesvirus-6 and -7 DNA in cerebrospinal fluid of facial palsy patients". *Acta Otolaryngol.* 128(4), 460-464 (2008).
  12. Ginanneschi F, Donati D, Moschettini D, Dominici F, Cermelli C, Rossi A. "Encephaloradiculomyelitis associated to HHV-7 and CMV co-infection in immunocompetent host". *Clin. Neurol. Neurosurg.*, 109(3), 272-276 (2007).
  13. Calvario A, Bozzi A, Scarasciulli M, Ventola C, Seccia R, Stomati D, Brancasi B.: "Herpes Consensus PCR test: a useful diagnostic approach to the screening of viral diseases of the central nervous system". *Journal Clinic Virology*, 25(suppl.), S71-S78 (2002).
  14. Deback C, Agbalika F, Scieux C, Marcelin AG, Gautheret-Dejean A, Cherot J, Hermet L, Roger O, Agut H.: "Detection of human herpesviruses HHV-6, HHV-7 and HHV-8 in whole blood by real-time PCR using the new CMV, HHV-6, 7, 8 R-genetrade mark kit". *Journal Virology Methods*, 149(2), 285-291 (2008).

15. Hubacek P, Sedlacek P, Keslova P, Formankova R, Stary J, Kulich M, Cinek O.: "Incidence of HHV7 in donors and recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation". *Pediatric Blood Cancer*. 50(4), 935 (2008).
16. Holden SR, Vas AL.: "Severe encephalitis in a haematopoietic stem cell transplant recipient caused by reactivation of human herpesvirus 6 and 7". *Journal Clin Virology*, 40(3), 245-247 (2007).
17. Berger C, Hug M, Gysin C, Molinari L, Frei M, Bossart W, Nadal D.: "Distribution patterns of beta- and gamma-herpesviruses within Waldeyer's ring organs". *Journal Med. Virology*, 79(8), 1147-1152 (2007).
18. Chen T, Hudnall SD.: "Anatomical mapping of human herpesvirus reservoirs of infection". *Mod. Pathol.*,19(5), 726-737 (2006).
19. Mendoza LP, Bronzoni RV, Takayanagui OM, Aquino VH, Figueiredo LT.: "Viral infections of the central nervous system in Brazil". *Journal Infect.*, 54(6), 589-596 (2007).
20. Kaneko H, Kawana T, Ishioka K, Ohno S, Aoki K, Suzutani T. "Evaluation of mixed infection cases with both herpes simplex virus types 1 and 2". *Journal Med. Virology*, 80(5), 883-7 (2008).
21. Ulrich C, Hackethal M, meyer T, Geusau A, Nindl I, Ulrich M, Forschner T, Sterry W, Stockfleth E.: "Skin infections in organ transplant recipients". *Journal Dtsch Dermatol Ges.*, 6(2), 98-105, (2008).
22. Anne de Pagter PJ, Schuurman R, Visscher H, de Vos M, Bierings M, van Loon AM, Uiterwaal CS, van Baarle D, Sanders EA, Boelens J.: "Human herpes virus 6 plasma DNA positivity after hematopoietic stem cell transplantation in children: an important risk factor for clinical outcome". *Biol. Blood Marrow Transplant*, 14(7), 831-839 (2008).
23. Kim DH, Messner H, Minden M, Gupta V, Kuruvilla J, Wright J, Lipton J.: "Factors influencing varicella zoster virus infection after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: low-dose acyclovir prophylaxis and pre-transplant diagnosis of lymphoproliferative disorders". *Transpl. Infect Dis.*, 10(2), 90-98 (2008).
24. Dolcetti R.: "B lymphocytes and Epstein-Barr virus: the lesson of post-transplant lymphoproliferative disorders". *Autoimmun Rev.*, 7(2):96-101 (2007).
25. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Mizukami M, Morio T, Sugamoto Y, Mochizuki M.: "Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis". *Br. J. Ophthalmol.*, 11 (2008)

26. Karatas H, Gurer G, Pinar A, Soylemezoglu F, Tezel GG, Hascelik G, Akalan N, Tuncer S, Ciger A, Saygi S.: "Investigation of HSV-1, HSV-2, CMV, HHV-6 and HHV-8 DNA by real-time PCR in surgical resection materials of epilepsy patients with mesial temporal lobe sclerosis". *J. Neurol Sci.*, 164(1-2); 151-6 (2008).
27. Dierssen U, Rehren F, Henke-Gendo C, Harste G, Heim A.: "Rapid routine detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid by a one-step real-time RT-PCR assay". *Journal Clin. Virology*, 42(1): 58-64 (2008).
28. Read SJ, Mitchell JL, Fink CG.: "LightCycler multiplex PCR for the laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system". *Journal Clin. Microbiology*, 39(9): 3056-3059 (2001).