



B I O M É R I E U X

# Manual de Carga Viral HIV-1

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## **Índice**

Introdução.....	001
Conceitos Básicos - Biologia Molecular.....	002
Conceitos Básicos do HIV - 1.....	012
Biossegurança.....	018
Preparo de soluções.....	022
Coleta, manuseio e transporte.....	023
Divisão de área física.....	025
Metodologia de quantificação do RNA viral do HIV.....	027
Bayer.....	030
Teste Versant HIV 3.0 bDNA.....	031
Técnica, apresentação, procedimento de ensaio.....	036
Procedimento de operação do sistema.....	041
Manutenção e limpeza.....	060
Procedimento básicos de análise de resultados.....	070
Contatos com a Bayer.....	078
BioMérieux Brasil.....	079
Teste Nuclisens HIV - 1 QT.....	080
Técnica , apresentação, procedimento de ensaio.....	085
Procedimento de operação do sistema.....	105
Manutenção e limpeza.....	123
Procedimento básicos de análise de resultados.....	130
Contatos com a BioMérieux Brasil.....	140
Roche.....	141
Teste Amplicor HIV - 1 Monitor.....	142
Técnica, apresentação, procedimento de ensaio.....	152
Procedimento de operação do sistema.....	159
Manutenção e limpeza.....	193
Procedimento básicos de análise de resultados.....	201
Contatos com a Roche.....	229

## Introdução

Este manual visa orientar os usuários da Rede Nacional de Laboratórios de Carga Viral no sentido da realização correta dos testes dentro dos padrões de qualidade preconizados pelo Ministério da Saúde - Programa Nacional de DST e Aids.

As técnicas modernas de biologia molecular permitiram que fossem desenvolvidos procedimentos para a quantificação dos níveis de RNA viral no plasma de indivíduos infectados pelo HIV.

A quantificação do RNA do HIV-1 (Carga Viral) é considerada o marcador laboratorial mais adequado para o estabelecimento do prognóstico de indivíduos infectados, para o monitoramento da resposta terapêutica aos anti-retrovirais e na avaliação da progressão da doença. Com base nessas quantificações, sabe-se que níveis altos de RNA plasmáticos estão associados à queda rápida na população de linfócitos TCD4 e à progressão mais rápida para AIDS.



Nessa perspectiva o Ministério da Saúde, por meio do Programa Nacional de DST e AIDS, implantou as Redes laboratoriais para a Carga Viral e para contagem de linfócitos TCD4.

Neste manual você vai encontrar informações a respeito das três metodologias implantadas pelo Programa Nacional de DST e AIDS.

## Conceitos básicos de Biologia Molecular

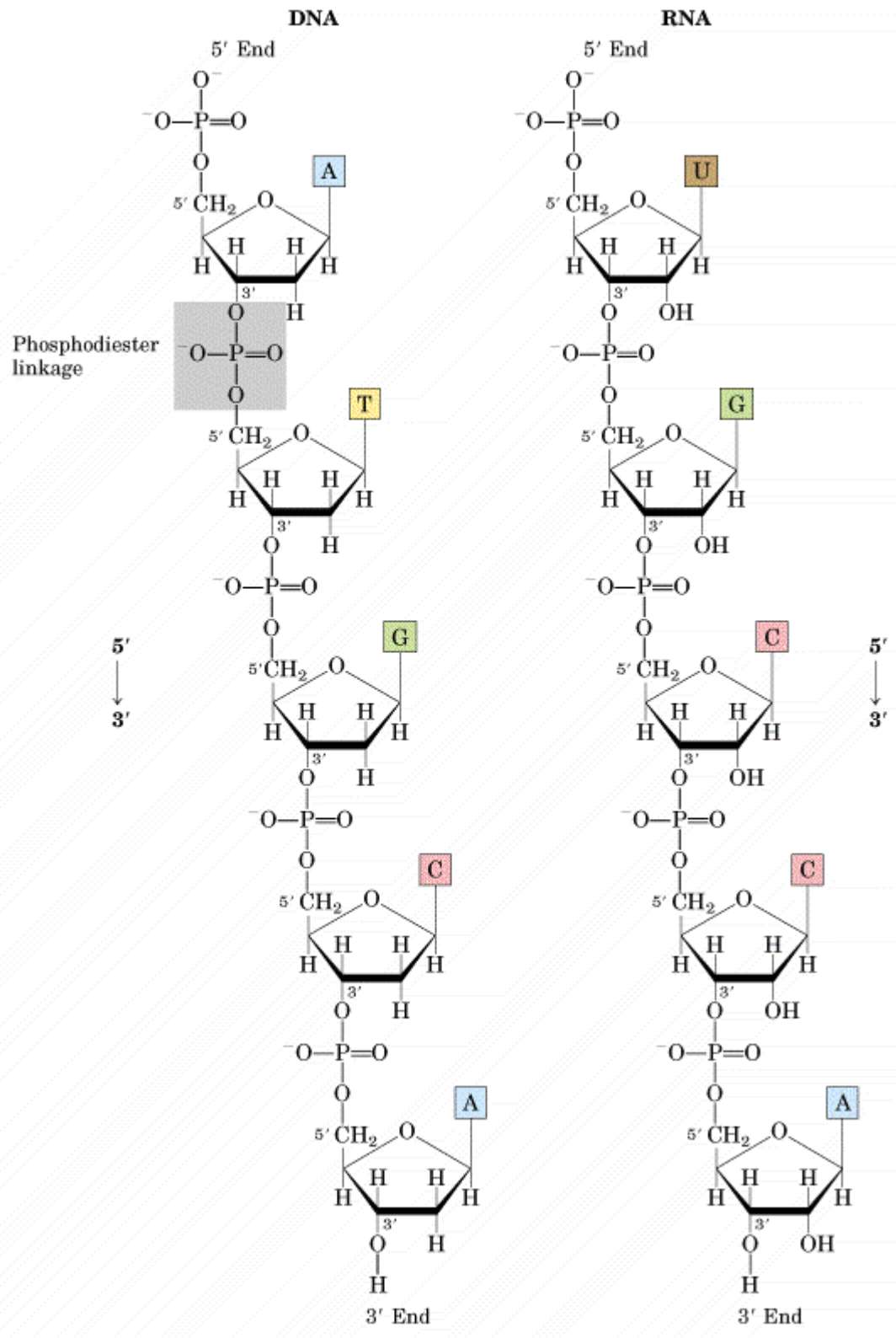
### Ácidos Nucléicos

Ácidos nucleicos são polímeros que resultam da repetição de quatro diferentes unidades denominados nucleotídeos. A seqüência linear dos quatro nucleotídeos na molécula de DNA é a fonte básica da informação genética.

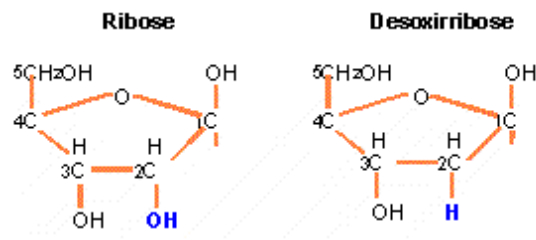
Os ácidos nucleicos são macromoléculas. Todos os organismos vivos contem ácidos nucleicos na forma de DNA – ácido desoxirribonucléico e RNA – ácido ribonucléico.

Os ácidos nucleicos são compostos por uma molécula de açúcar (pentose), bases nitrogenadas (purinas e pirimidinas) e ácido fosfórico. A molécula de ácido nucleico é um polímero linear no qual os monômeros (nucleotídeos) são interligados por "pontes" ou ligações do tipo fosfodiéster. Essas ligações unem o carbono 3' da pentose do nucleotídeo adjacente. Assim sendo, o esqueleto de um ácido nucleico é composto por fosfatos e pentoses que se alternam. As bases nitrogenadas estão ligadas aos açúcares desse esqueleto. O ácido fosfórico utiliza dois de seus três grupos ácidos nas ligações diéster 3' e 5'. O grupo remanescente confere ao nucleotídeo suas propriedades de ácido.

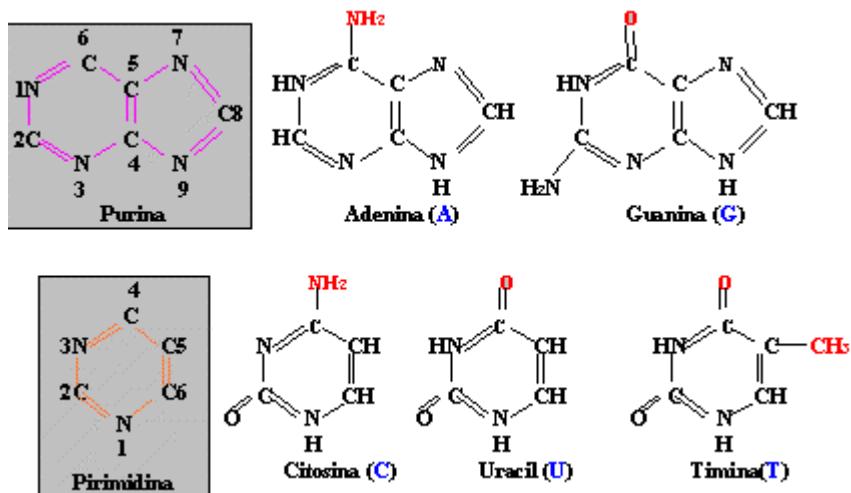
O DNA é o principal armazenador da informação genética. Esta informação é copiada ou transcrita para moléculas de RNA, cujas seqüências de nucleotídeos contem o "código" para a ordenação específica de aminoácidos. As proteínas são então sintetizadas em um processo que envolve a tradução do RNA.



As pentoses são de dois tipos: ribose no RNA e desoxirribose no DNA. A única diferença entre esses dois açúcares é que a desoxirribose possui um átomo de oxigênio a menos.



As bases encontradas nos ácidos nucleicos são também de dois tipos: pirimidinas e purinas. As pirimidinas possuem um único anel heterocíclico, enquanto as purinas têm dois anéis unidos. No DNA, as pirimidinas são timina (T) e citosina (C); as purinas são adenina (A) e guanina (G). O RNA contém uracila (U) no lugar da timina.

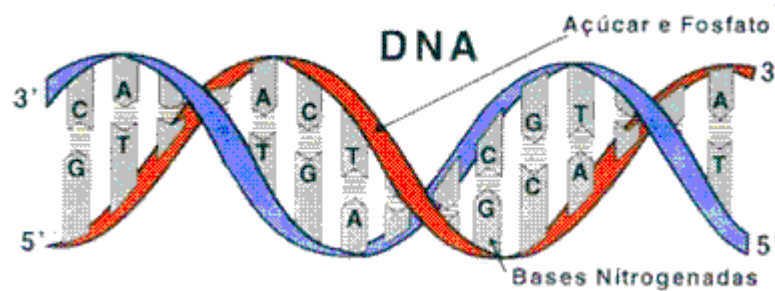


## DNA

O DNA contém as informações necessárias para manter a hereditariedade das células vivas. Em 1953, baseados nos dados de difração de raios X de Wilkins e Franklin, Watson e Crick propuseram um modelo de estrutura do DNA que explicava a regularidade da sua composição de bases e suas propriedades biológicas, particularmente sua duplicação na célula.

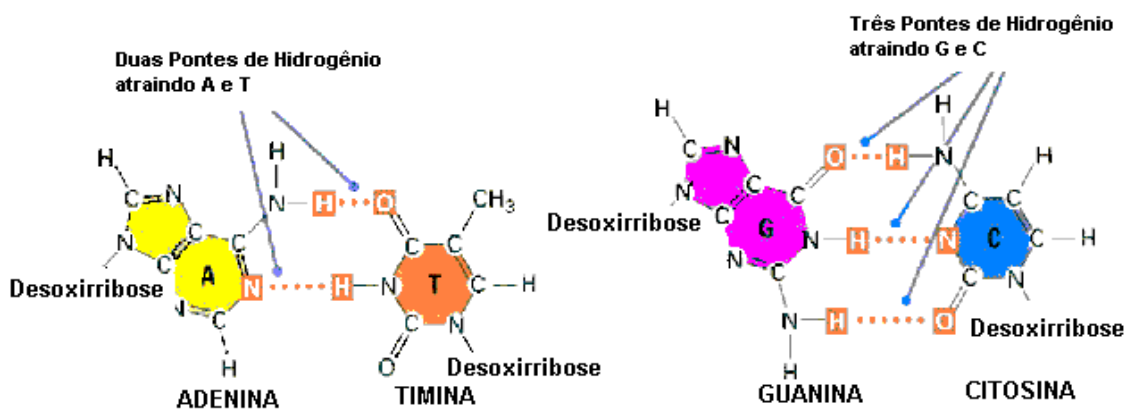
Quanto a sua estrutura, a molécula de DNA é constituída por duas cadeias helicoidais de polinucleotídeos com giro para a direita, formando uma hélice dupla em torno de um mesmo eixo central. Cada cadeia é constituída por resíduos do açúcar desoxirribose, unidos por ligações diésterfosfato através de seus carbonos 3' e 5'. Uma base nitrogenada encontra-se unida ao carbono 1' de cada resíduo do açúcar. As duas fitas são antiparalelas, mostrando que suas ligações fosfodiéster 3', 5' correm em direções opostas.

As bases estão empilhadas dentro da hélice, em um plano perpendicular ao seu eixo.



As bases nitrogenadas que compõem o DNA são: guanina, timidina, citosina e adenina.

As duas cadeias polinucleotídicas mantem-se unidas através de pontes de hidrogênio, que se estabelecem entre pares de bases específicas: adenina com timidina e citosina com guanina. Desde que exista uma distância fixa entre as duas moléculas de açúcar nas fitas opostas, somente certos pares de bases podem se encaixar na estrutura. Como vemos na figura, os únicos pares possíveis são o AT e o CG. É importante salientar que o par AT é unido por duas pontes de hidrogênio e o par CG, por três pontes de hidrogênio, isso faz com que o par CG seja mais estável que o AT.

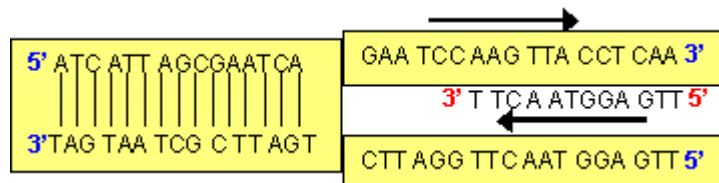


A seqüência axial de bases ao longo de uma cadeia de polinucleotídeo pode variar consideravelmente, porém na outra cadeia, a seqüência deve ser complementar.

Assim as duas cadeias que constituem um segmento de DNA são complementares entre si.

Durante a duplicação do DNA, as duas cadeias dissociam-se e cada uma age como um molde para a síntese da nova cadeia complementar.





Já que a estrutura de dupla hélice do DNA é preservada por ligações fracas, é possível separar as duas cadeias através de aquecimento ou pH alcalino. A temperatura necessária para romper os pares GC é maior do que a necessária para romper o par AT. A temperatura na qual ocorre a separação das cadeias de DNA (ponto de desnaturação) depende da razão AT/GC. Se o DNA após a desnaturação for vagarosamente resfriado, as cadeias complementares pareiam-se de forma ordenada, restabelecendo assim a conformação original de dupla hélice (reestruturação).

A reestruturação do DNA é usada para estimar o tamanho (nº de nucleotídeos) do genoma de um organismo. Um genoma grande leva mais tempo para se reestruturar do que um pequeno. Um DNA de cadeia única pode também se reestruturar com um RNA complementar, resultando em uma molécula híbrida onde há uma cadeia de DNA e outra de RNA. A hibridização molecular é um método para caracterizar RNAs, pois uma molécula de RNA se combina somente com a do DNA da qual foi transcrita.

## RNA

A estrutura do RNA é semelhante à do DNA, exceto pela substituição da ribose e da uracila. Os nucleotídeos do RNA também são formados por açúcar, uma base nitrogenada e ácido fosfórico. O açúcar do RNA é a ribose e as bases são, citosina, uracila, adenina e guanina.

As três classes principais de RNA são: RNA mensageiro, RNA de transferência e RNA ribossômico. Cada um consiste de uma fita única de ribonucleotídeos e possuem um peso molecular, uma seqüência nucleotídica e uma função biológica característica.

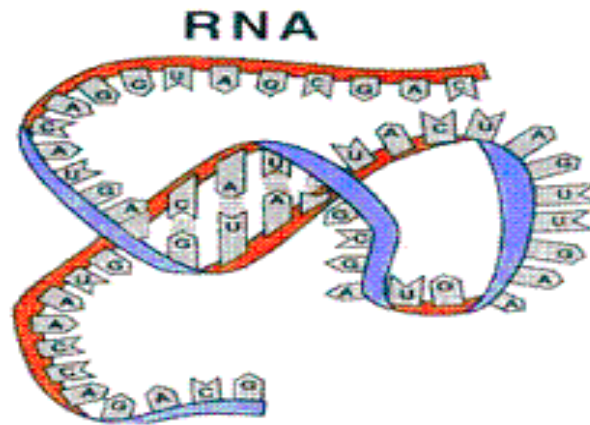
RNA mensageiro (RNAm) – funciona como molde usado pelos ribossomos para a tradução da informação genética na seqüência de aminoácidos das proteínas. A seqüência de nucleotídeos do RNAm é complementar à mensagem genética contida em um segmento específico da fita-molde de DNA.

RNA de transferência (RNAt) – identificam e transportam os aminoácidos até os ribossomos. Estão implicados na tradução das palavras do código genético do RNAm na seqüência trinucleotídica específica, chamada de anticódon, que é complementar a um códon, seqüência trinucleotídica do RNAm que codifica um aminoácido específico.

RNA ribossômico (RNAr) – são os principais componentes dos ribossomos, servem de suporte molecular para as reações químicas da montagem de polipeptídeos.

Apesar da molécula de RNA possuir uma única cadeia de polinucleotídeo, o RNA não é uma estrutura linear simples e lisa. As moléculas de RNA possuem extensas regiões de complementação nas quais as pontes de hidrogênio entre os pares de bases AU e GC são formadas unindo diferentes

porções da mesma molécula. Como resultado disso, a molécula dobra-se sobre si mesma, formando estruturas denominadas alças.



## Replicação do DNA

Toda célula ao se dividir, tem seu conteúdo de DNA duplicado na íntegra, transmitindo assim, todas as características genéticas. A esse processo, chamamos replicação. Ela ocorre de maneira semiconservativa, porque quando as duas fitas originais são separadas, cada uma vai servir de molde para a construção de uma fita nova.

A fita cópia é sintetizada pela ação catalisadora da DNA polimerase III, enzima que utiliza como molde à cadeia precursora e incorpora os nucleotídeos de forma seqüencial na nova cadeia, produzindo-a de acordo com a lei de pareamento das bases. Como essa polimerase sintetiza DNA na direção de 5' para 3', a síntese de uma das cadeias complementares é realizada de forma contínua enquanto que a outra é sintetizada descontinuamente. Os fragmentos da cadeia descontínua são ligados pela enzima DNA ligase. Muitas outras proteínas estão envolvidas na estabilização e manutenção da integridade das cadeias simples que são precursoras para a síntese da fita dupla, assim como no reconhecimento dos sítios de iniciação. As Dna polimerases possuem além da função de sintetizar polinucleotídeos, atividade exonucleásica chamada de "correção de leitura" na qual os nucleotídeos incorporados incorretamente são removidos. Essa propriedade é fundamental para a manutenção da integridade da seqüência original.

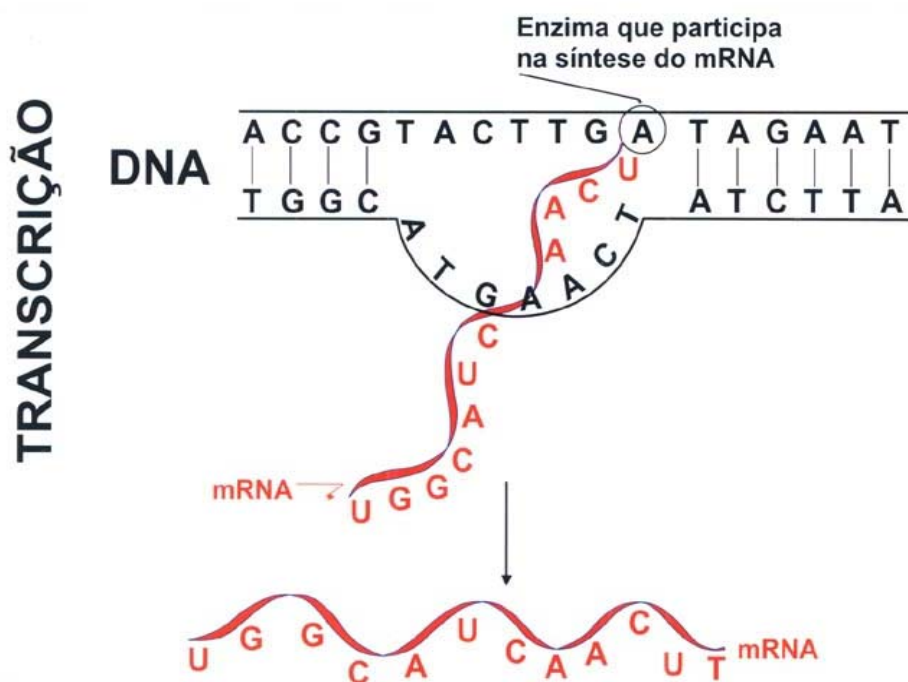
Muito da complexidade inerente à replicação de DNA advém do fato de que as duas cadeias da dupla hélice se orientam em direções opostas (5' → 3' e 3' → 5') e suas cópias devem, igualmente, apresentar direções opostas. Ainda, o alongamento de todas as cadeias-cópias individuais ocorre na direção 5' → 3'. Esse aparente paradoxo foi esclarecido com a descoberta de que uma fita-cópia cresce continuamente em uma direção, enquanto a outra fita-cópia é construída de forma descontínua, a partir de porções menores que se alongam, individualmente em direção oposta. Essa construção necessita de duas enzimas – a DNA polimerase I para preencher as lacunas e a DNA ligase para juntar os fragmentos.

## Transcrição

A síntese protéica não é resultante da leitura direta da seqüência nucleotídica do DNA. Como o DNA está localizado no cromossomo, no núcleo da célula e a síntese protéica ocorre quase que na sua íntegra, nos ribossomos localizados no citoplasma, as informações genéticas contidas na seqüência nucleotídica do DNA tem que ser transferida para uma molécula intermediária que pode mover-se para o citoplasma, o RNA mensageiro.

Apenas uma das fitas do DNA é transcrita dando origem a uma única seqüência de RNAm para cada gene. A indicação de qual fita deve ser transcrita é orientada por uma seqüência específica chamada promotor, localizada antes da seqüência a ser transcrita, que é reconhecida pela RNA polimerase (enzima sintetizadora de RNAm). Como a RNA polimerase adiciona seqüencialmente monofosfatos de ribonucleosídeo à extremidade 3' da cadeia de RNA em crescimento, a polimerização ocorre na direção 5' → 3'. Isso significa que cada molécula de RNAm será idêntica à seqüência nucleotídica da fita de DNA que não é transcrita. O RNAm transcrito é transportado para os ribossomos – (RNAr) no citoplasma, onde ocorre a síntese protéica.

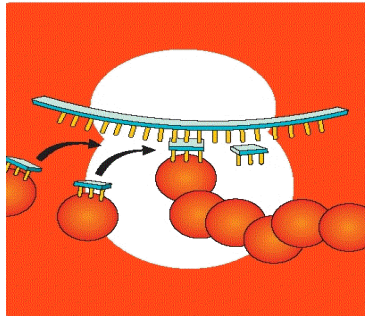
No caso dos retrovírus, a informação genética segue o sentido inverso – de RNA para DNA – Esse processo é conhecido por transcrição reversa e ocorre devido à presença de uma enzima – a transcriptase reversa .



## Tradução

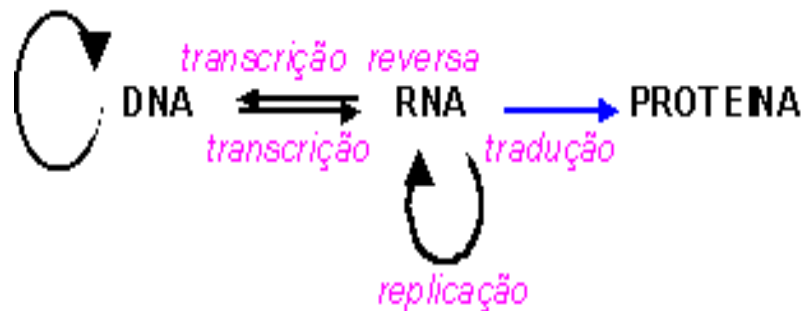
A relação entre a seqüência de nucleotídeos do DNA e a seqüência de aminoácidos da proteína correspondente é denominado código genético. O código genético é lido em grupo de três nucleotídeos, sendo que cada grupo de 3, codifica um aminoácido. Cada seqüência de trinucleotídeos é chamada de códon. O processo de decodificação pelo qual a informação genética

presente na molécula de RNAm dirige a síntese protéica é chamada tradução. Esse processo envolve os três RNAs – mensageiro, ribossômico e de transferência.



Na tradução, o ribossomo liga-se primeiro a um sitio específico na molécula de RNAm (códon de iniciação – ATG) que ajusta a fase de leitura. O ribossomo então se movimenta ao longo da molécula de RNAm, traduzindo um códon de cada vez usando os RNAt para adicionar aminoácidos ao final da cadeia polipeptídica em alongamento. A tradução é finalizada quando o ribossomo reconhece na fita de rNAm a presença do códon de terminação. A direção da leitura é de 5' → 3', sendo que a seqüência de nucleotídeos da fita de DNA corresponde à seqüência de aminoácidos da proteína traduzida na direção do N-terminal para C-terminal.

### Duplicação



## Glossário:

**Antiparalelo:** termo que descreve o alinhamento de dois filamentos de DNA em uma hélice, com suas ligações 3', 5' fosfodiéster em direções opostas.

**Ácido nucléico:** macromolécula composta por unidades repetidas de uma molécula de açúcar, uma base nitrogenada e ácido fosfórico (uma pentose, um fosfato e quatro bases).

**Desnaturação:** separação dos filamentos complementares de uma molécula de DNA através de meios físicos ou químicos, pela ruptura das pontes de hidrogênio presentes entre os pares de bases.

**DNA:** molécula helicoidal de duplo filamento no qual a informação genética é codificada na seqüência de bases de purina e pirimidina, os pares são ligados por pontes de hidrogênio e longitudinalmente há um esqueleto de açúcar-fosfato.

**Dupla hélice:** configuração típica adotada pelas cadeias de polinucleotídeos do DNA.

**Iniciador (Primer):** pequeno segmento sintético de DNA, com comprimento e seqüência definidos, usados para localizar e iniciar a síntese e amplificação de um segmento de DNA-alvo.

**Nucleosídeo:** nucleotídeo sem o ácido fosfórico. É a combinação de uma molécula de pentose e uma base nitrogenada.

**Nucleotídeo:** é a combinação de uma molécula de pentose, uma base nitrogenada e um ácido fosfórico.

**Pentose:** molécula de açúcar com cinco átomos de carbono, ribose no RNA e desoxirribose no DNA.

**Pirimidina:** tipo de base nitrogenada encontrada em ácidos nucléicos, composta por um anel heterocíclico (C,T, U).

**Ponte de hidrogênio:** interação fraca, não covalente, que resulta do compartilhamento de um próton entre átomos eletronegativos adjacentes; liga os filamentos antiparalelos de DNA unindo os pares de bases AT e GC; também encontrada em proteínas.

**Purina:** tipo de base nitrogenada encontrada em ácidos nucléicos, composta de dois anéis ligados (A ou G).

**Reestruturação:** processo pelo qual, filamentos separados de uma molécula de DNA podem reestruturar-se como consequência das propriedades de pareamento de bases do nucleotídeo.

**RNA:** molécula de um único filamento que possui uma estrutura de subunidades semelhante à do DNA; relacionada com a tradução do DNA em proteína.

**Seqüência axial:** seqüência linear de bases ao longo de um filamento da molécula de DNA.

**Seqüência complementar:** seqüência correspondente à do filamento axial, rigidamente determinada pelas regras do pareamento de bases AT/GC.

**Sonda:** pequena seqüência de DNA usada para isolar ou detectar uma seqüência-alvo complementar na reação.

**Tradução:** processo através do qual uma proteína é sintetizada a partir de aminoácidos de acordo com as especificações codificadas no RNA.

**Transcrição:** processo através do qual uma molécula de RNA é polimerizada em um modelo de DNA com o auxílio de diversas enzimas.

**Transcrição Reversa:** processo de síntese do cDNA (DNA complementar) usando um molde de RNA.

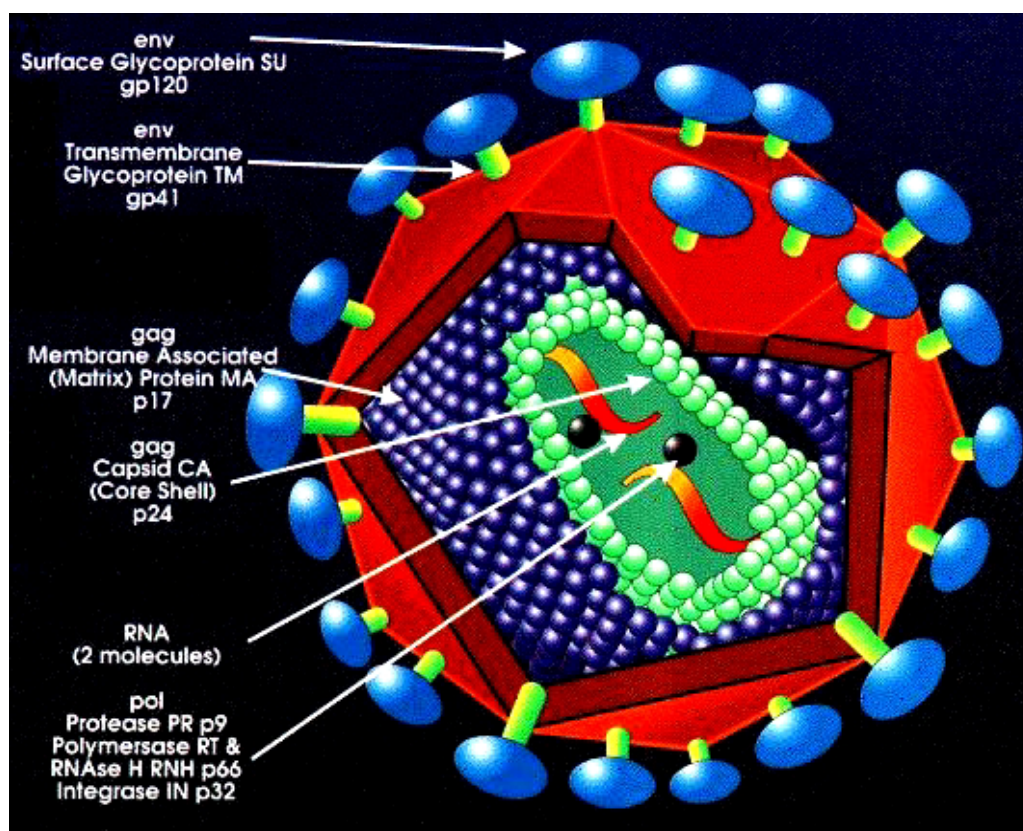
## Conceitos Básicos

### O HIV

O HIV pertence à família Retroviridae, gênero dos Lentivirus.

### Estrutura viral e genômica

O HIV possui forma esférica, tem aproximadamente 110nm de diâmetro e a estrutura da partícula viral infectante também chamada de vírion está esquematizada na figura abaixo, nela você observa o ácido ribonucléico (RNA), o envelope e as proteínas estruturais de uma partícula viral

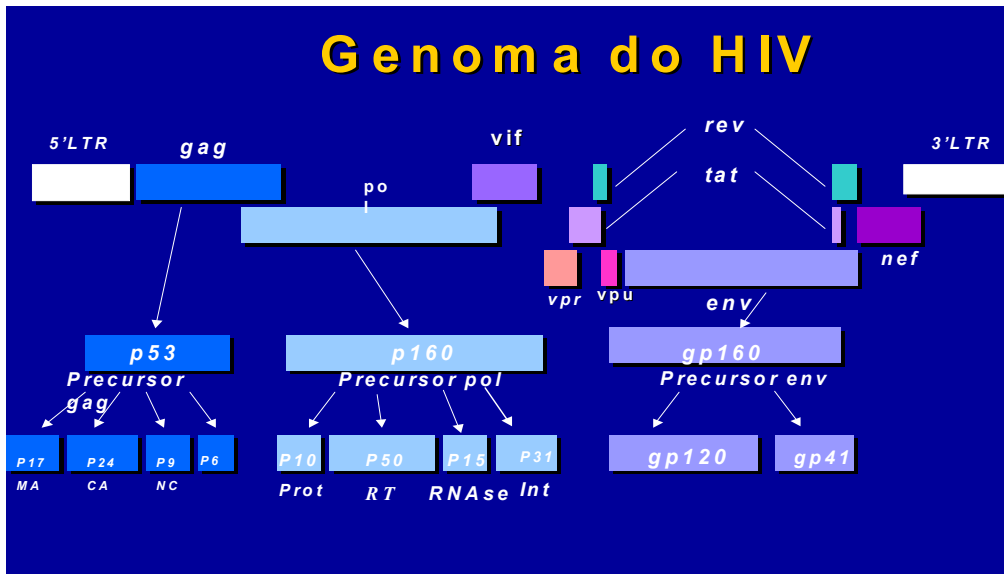


Na figura podem ser observadas as proteínas estruturais que são codificadas pelos genes gag, env e pol. O gene gag, codifica as proteínas do capsídeo viral (p24 e p17); o gene env, as glicoproteínas contidas no envelope do vírus (gp41 e gp120); e o gene pol, codifica as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease. Os números das proteínas e glicoproteínas indicam seus pesos moleculares.

O HIV apresenta genoma diplóide – duas moléculas de RNA de fita simples de polaridade positiva – de 9,8Kb covalentemente ligadas dentro de um nucleocapsídeo protéico em formato de cone, circundado por um envelope lipoprotéico onde se encontram ancoradas as glicoproteínas.

O genoma já foi todo seqüenciado e analisado, sendo que seus genes receberam a seguinte nomenclatura: **gag, pol, vif, vpr, tat, rev, vpu, env** e **nef**.

# Genoma do HIV



As proteínas sintetizadas a partir do gene gag compõem o núcleo ("core") que envolve o genoma viral. O gene gag é traduzido na forma de uma proteína precursora Pr55<sup>gag</sup>, que é posteriormente clivada para compor as proteínas p17 (proteína de matriz), p24 (proteína estrutural do capsídeo), p9 (proteína do nucleocapsídeo que se liga fortemente ao RNA viral) e p6. O gene pol também é traduzido na forma de um precursor, Pr160<sup>gag-pol</sup> e codifica para as enzimas virais: Protease (p10), Transcriptase Reversa Rnase-H (p51/66) e Integrase (p32). O gene vif (p23), parece atuar aumentando a infectividade, mas sua função ainda não foi totalmente elucidada. A função do gene vpr (p15) codifica os ativadores da transcrição. A proteína p14, codificada pelo gene tat, atua como transativador transcricional, interagindo com fatores de transcrição celulares e a seqüência TAR viral, promovendo a iniciação e alongação dos transcritos virais. O gene ver (p19), indispensável à replicação viral, age como transativador pós-transcricional, ligando-se à seqüência RRE viral e fatores celulares, promovendo "splicing" e/ou transporte do RNAm viral. O gene vpu (p16) influencia a liberação das partículas virais e aumenta a reciclagem do antígeno CD4+. O gene env codifica a glicoproteína precursora gp160, que posteriormente é clivada para formar a gp41, transmembranar, e a gp120, glicoproteína de face externa, responsável pela ligação do vírus ao receptor celular. Por fim, o gene nef (p27) potencializa a infectividade viral, mantendo altos os níveis de infecção.

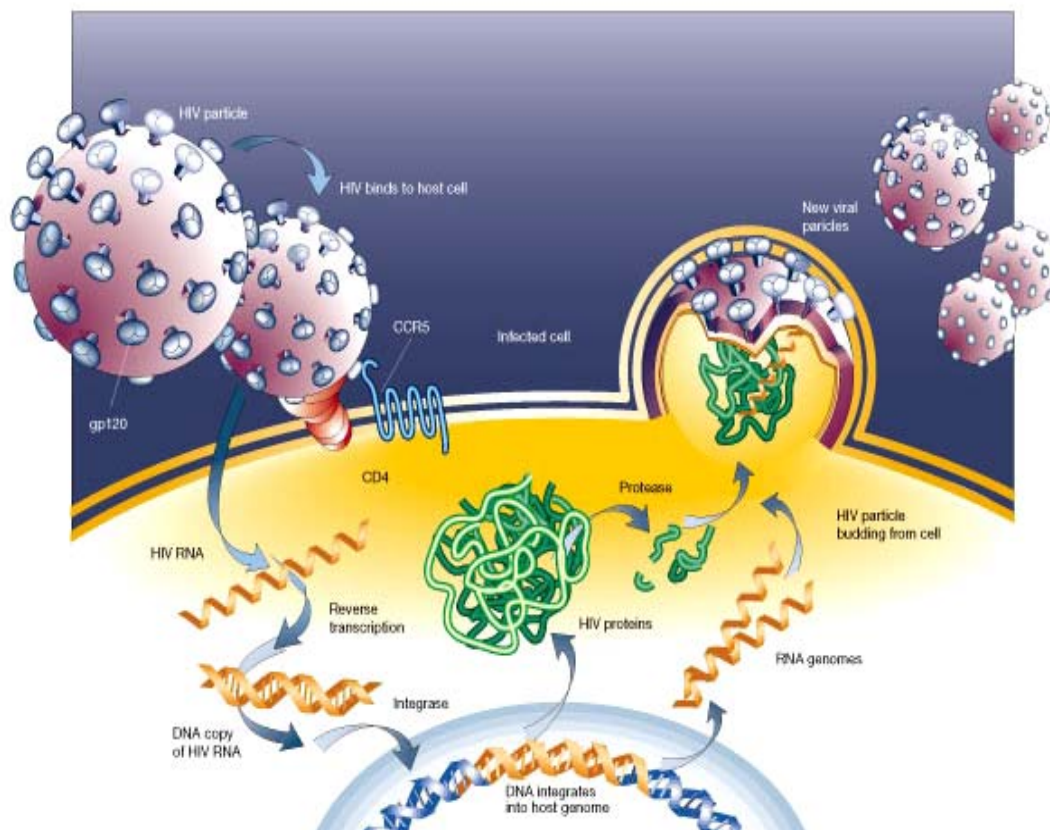
Genoma: informação genética total contida em uma célula ou organismo.

Gene: região do DNA que controla uma característica genética. Usualmente um gene codifica uma proteína.



## A Replicação do HIV

A figura abaixo, mostra como ocorre a replicação do HIV no organismo humano.



O principal receptor para a entrada do HIV-1 na célula do hospedeiro é o linfócito TCD4+.

A infecção tem início quando uma partícula viral, que contém duas cópias de RNA HIV encontra uma célula com uma molécula de superfície chamada CD4.

A interação do vírus com a membrana celular é feita pela ligação da gp 120 ao receptor CD4 da célula hospedeira, porém co-receptores ou receptores secundários são também necessários para a entrada do vírus na célula.

Participam desse processo, co-receptores de quimiocinas – CCR5 e CXCR4 (fusinas).

Quando o gene que codifica o CCR5, apresenta uma deleção mutante, o receptor celular codificado por esse gene fica estruturalmente alterado. A condição de homozigose está associada a um efeito protetor à infecção pelo HIV-1. A condição de heterozigose, apesar de não proteger o indivíduo da infecção, está associada à não progressão, ou períodos de latência clínica mais prolongados.

Embora as células TCD4+ pareçam ser o principal alvo para o HIV, outras células do sistema imune com moléculas CD4 em suas superfícies também são infectadas. Entre elas estão os monócitos e macrófagos, que podem

hospedar grandes quantidades de vírus sem serem mortos, desse modo, atuam como reservatórios.

Após a interação da membrana do envelope viral com a membrana celular, ocorre uma alteração conformacional que expõe um peptídeo de fusão – a gp41. O capsídeo viral é então liberado no citoplasma da célula hospedeira.

Observe, na figura, que por ação da transcriptase reversa do vírus, no citoplasma da célula, a fita de RNA serve de molde para a transcrição reversa de duas fitas complementares de DNA viral (cDNA).

Transcrição reversa: síntese do DNA, a partir do RNA, realizada pela enzima transcriptase reversa.

O cDNA viral (de fita dupla) é transportado para o núcleo, e é incorporado ao genoma da célula hospedeira pela ação da integrase, e passa a ser denominado provírus.

Provírus: é o DNA do HIV incorporado aos genes da célula hospedeira.

OBS: Em um mesmo organismo o provírus pode, em algumas células, permanecer em latência e não dar sinal de sua presença. Em outras células, o processo replicativo pode ser lento com multiplicação controlada, ou acelerado levando à lise celular.

Para que o DNA proviral produza novos vírus, cópias de RNA devem ser feitas.

O provírus, para se replicar, subverte a maquinaria celular e passa a comandar os mecanismos enzimáticos da célula hospedeira. Isso significa dizer que as enzimas celulares passam a trabalhar na síntese de RNAs genômicos mensageiros (mRNA) e na síntese de proteínas virais.

As citocinas, proteínas envolvidas na regulação normal da resposta imune, podem também regular a transcrição. Moléculas como fatores de necrose tumoral (TNF)-alfa e interleucina (IL)-6, secretados em níveis elevados pelas células de pacientes HIV positivos, podem auxiliar na ativação do DNA proviral.

Outras infecções, por organismos tais como *Mycobacterium tuberculosis*, podem também melhorar a transcrição.

O RNAm viral é transportado do núcleo celular para o citoplasma e começa a tradução das proteínas virais, utilizando a maquinaria celular de síntese protéica. O próximo passo é a montagem da partícula viral (proteínas e RNAs virais) e o ancoramento da partícula à membrana plasmática da célula hospedeira. Uma partícula viral imatura é formada e ao aderir à membrana celular, adquire um envelope. Ocorre o brotamento do vírus imaturo de forma intensa provocando a destruição da célula hospedeira. Durante este ponto do ciclo de vida viral, o core do vírus é imaturo, e ainda não é infeccioso. O amadurecimento é feito pela ação da protease viral que cliva as longas cadeias de proteínas e enzimas que constituem o core em pedaços menores. Essa clivagem resulta em partículas virais infecciosas.

## Dinâmica do HIV no organismo infectado

O linfócito TCD4+ é a principal célula-alvo do HIV.

Estudos indicam que cerca de 10 bilhões de vírus são produzidos por dia e que essas partículas virais tem uma meia vida de aproximadamente 4 horas. De forma semelhante, um grande número de linfócitos TCD4+ é produzido e destruído, sendo que a meia vida de um linfócito infectado é de 2,4 dias.

Não há, portanto, período de latência virológica e, mesmo durante a infecção crônica assintomática, observa-se uma grande batalha entre o sistema imune do indivíduo infectado e o vírus. Com o passar do tempo, o vírus desestrutura a arquitetura dos órgãos linfáticos, comprometendo a reposição dos linfócitos TCD4+.



A produção e eliminação diária das partículas virais podem ser comparadas a um movimento de água que sai de uma torneira em direção ao ralo de uma pia. A quantidade de vírus que resta na pia é a carga viral, resultado da guerra que é travada entre o CD4 e os vírus.

## Carga Viral

O número de partículas virais presente em uma determinada amostra de um indivíduo infectado é conhecido como carga viral.

A carga viral plasmática, detectada na forma de RNA do HIV, reflete a dinâmica desse vírus nos indivíduos infectados, quantificando as partículas que estão sendo produzidas e lançadas na circulação sanguínea.

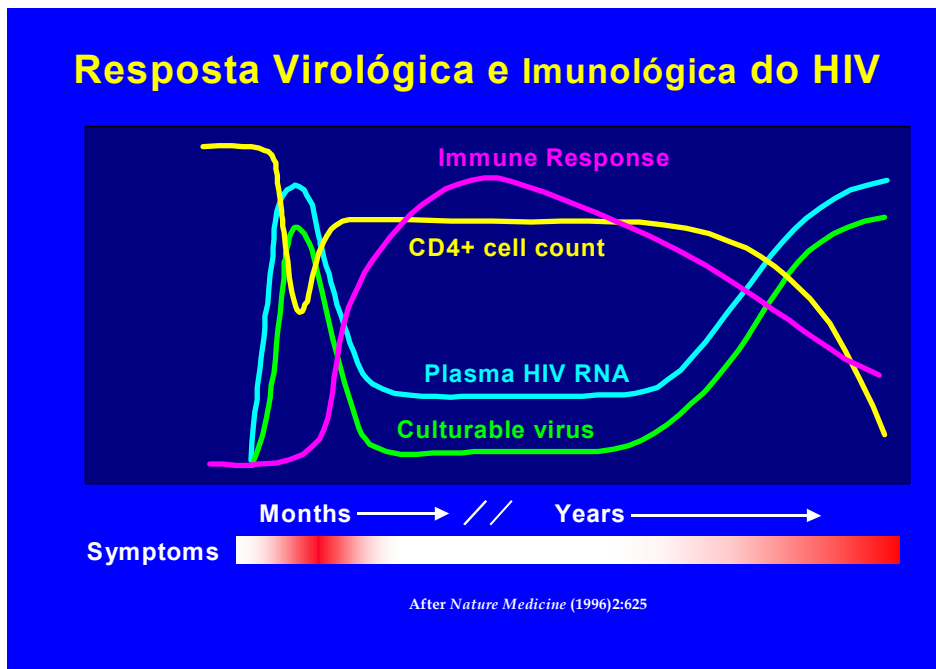
O nível de RNA do HIV no plasma é um marcador clínico importante. O número de partículas virais é mais elevado durante a infecção primária e mais baixo na fase assintomática. Existe uma relação direta entre a quantidade de HIV detectada e a rapidez com que a infecção progride. Níveis elevados de replicação do vírus e o aumento da carga viral estão associados à deterioração acelerada do sistema imune.

O colapso do sistema imune, que antecede o aparecimento da aids, é resultado da destruição das células CD4+ e das alterações imunitárias provocadas pelo vírus.

Na figura abaixo, observe as variações nas contagens de linfócitos TCD4+ e na carga viral, ao longo da infecção pelo HIV.

A carga viral é útil para:

- avaliar a progressão da doença
- indicar o início da terapia e
- determinar a eficácia dos anti-retrovirais



## Biossegurança

Materiais biológicos tais como sangue, soro e células são potencialmente infectantes e muitas vezes estão contaminados com agentes etiológicos diferentes do que se está pesquisando, ou ainda desconhecidos. Por isso é fundamental que medidas de biossegurança adequadas sejam adotadas nos laboratórios onde há manipulação desses materiais.

Equipamentos de Proteção Individual – EPI - devem ficar em lugar de fácil acesso aos funcionários do laboratório.

- Óculos de segurança, protetor facial e máscaras descartáveis – usadas sempre que houver possibilidade de aerossóis.
- Jaleco longo de mangas compridas e punho retrátil, preferencialmente descartável– deve ser usados somente dentro da área do laboratório.
- Luvas descartáveis – devem ser resistentes, de material sintético (vinil) ou látex para manipulação de materiais potencialmente infectantes. As luvas descartáveis, usadas para os procedimentos da técnica - PCR (Polimerase Chain Reaction) – devem ser isentas de talco.
- Pipetas automáticas – devem estar calibradas e validadas.
- Propés descartáveis
- Calçados fechados e de material resistente.

**Usar EPI é um direito seu e a instituição em que você trabalha é obrigada a fornecê-los.**

Equipamentos de Proteção Coletiva – EPC – são utilizados para minimizar a exposição dos funcionários ao risco e em caso de acidentes, reduzir suas conseqüências.

- Chuveiro de emergência e lava-olhos - devem estar instalados próximos ao ambiente laboratorial.
- Extintores de incêndio
- Centrífugas com rotor provido de tampa.
- Cabines de segurança biológica – classe II – devem ser posicionadas longe de portas, janelas e de equipamentos que de alguma forma promovam a movimentação do ar, empurrando ar não filtrado, diretamente para a superfície de trabalho, podendo assim contaminar o material que está sendo manipulado.

**Os laboratórios são obrigados a manter os EPC em boas condições de funcionamento. Todos os funcionários devem receber treinamento para utilizá-los. Esses equipamentos devem estar sinalizados e instalados ou colocados em locais conhecidos de todos e de fácil acesso.**

Evitar a formação de aerossóis, seguindo algumas normas como:

- Abrir os tubos contendo sangue, com a parte a ser aberta, envolvida em um pedaço de gaze ou papel absorvente. Usar uma gaze diferente para cada tubo , evitando assim a contaminação cruzada. A gaze depois de usada deve ser descartada em hipoclorito de sódio a 2% . Esse procedimento deve ser feito preferencialmente dentro de uma cabine de segurança biológica.
- Quando utilizar centrífugas e agitadores magnéticos, espere até a parada completa do equipamento para manipular o material.
- Verifique sempre que utilizar a centrífuga se ocorreu algum vazamento em seu interior durante o procedimento de centrifugação. Neste caso limpe-a com hipoclorito de sódio a 2%.

### Descarte do Material Biológico

- Deixar o material descartado tais como ponteiras e gazes utilizadas, imerso em uma solução de hipoclorito de sódio a 2 %, por um tempo mínimo de 24 horas, antes de ser autoclavado. Após esse tempo, drene o hipoclorito e descarte-o na rede de esgoto. Esse procedimento não oferece riscos para o meio ambiente, uma vez que depois de 24 horas o cloro já evaporou.
- Tubos contendo coágulos, sangue total ou soro puro devem ser autoclavados diretamente sem descontaminação prévia com hipoclorito, pois em presença de grande quantidade de matéria orgânica ele é ineficiente.
- Os resíduos, especialmente os perfuro - cortantes, devem ser descartados em recipientes de paredes rígidas , com tampa, contendo hipoclorito de sódio a 2 %. O material dispensado não deve ultrapassar 2/3 do volume do recipiente para que o hipoclorito não perca sua capacidade de desinfecção.
- Colocar os resíduos sólidos em sacos próprios para autoclavagem e após o procedimento (mínimo de 45 minutos em temperatura de 121°C), acondicionar em sacos plásticos de cor branca identificados com o símbolo de risco biológico e a informação de **para incinerar** ou **para aterro sanitário** de acordo com o procedimento utilizado na sua região.

### Desinfecção do Laboratório

A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE recomenda que os laboratórios sigam algumas normas, como:

- O lixo do laboratório deve ser retirado 2 vezes ao dia.
- Semanalmente esvaziar o conteúdo do banho-maria, lavar seu interior e colocar água destilada. Checar a temperatura após esse procedimento.

- O piso deve ser limpo antes e no final da rotina de trabalho com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%. Usar panos de chão distintos para a limpeza das salas.
- As bancadas devem ser descontaminadas com hipoclorito de sódio a 0,5% desde que não sejam de material metálico, nesse caso, proceder a limpeza com álcool 70% (p/p) antes e depois da rotina de trabalho.
- Limpar todos os equipamentos – pipetas, centrífugas, agitadores, termoblocos, etc... – antes e depois de cada rotina, com álcool a 70% (p/p).
- Ao usar cabines de segurança que possuam lâmpada ultravioleta, acende-la por 20 minutos após a passagem do álcool a 70% (p/p).

Todos os procedimentos de limpeza devem ser feitos por pessoal qualificado. É importante verificar se essas pessoas estão usando os equipamentos de proteção individual (EPI) apropriados.

Procure manter como parte da sua rotina as seguintes práticas:

- Lave as mãos antes e depois de qualquer procedimento laboratorial.
- Nunca pipete com a boca.
- Não fume, não coma, não beba dentro da área do laboratório.
- Quando estiver usando luvas, não manuseie objetos de uso comum, como telefone, maçanetas e etc... e não saia da área do laboratório com elas.
- Não guarde alimentos e bebidas em geladeiras destinadas ao armazenamento de material biológico.
- Nunca entre na sala 1 (pré) se já entrou na sala 2 (pós). Se precisar fazê-lo, peça que alguém o faça para você.

## Preparo de soluções desinfetantes

### **Hipoclorito de sódio a 0,5% e a 2%**

Para preparar uma solução percentual de hipoclorito deve-se levar em conta a concentração de cloro ativo indicada no rótulo do hipoclorito que se tem disponível. Para o preparo da solução desinfetante, utilizar as seguintes fórmulas:

#### **1 – Fórmula para cálculo do volume necessário do hipoclorito disponível**

$$\text{volume necessário do Hd} = \frac{\text{VSH} \times \% \text{ de cloro ativo desejado}}{\% \text{ de cloro ativo do Hd}}$$

Hd → hipoclorito disponível

VSH → volume final da solução de hipoclorito no percentual de cloro ativo desejado

#### **2 – Fórmula para cálculo do volume de água a ser adicionado ao Hd para obter o hipoclorito no percentual de cloro ativo desejado**

$$\text{Volume de água a ser adicionado} = \text{VSH} - \text{volume necessário do Hd}$$

Hipoclorito no percentual desejado = volume necessário de Hd + volume de água

Exemplos

#### **1 – Exemplo de aplicação da fórmula para preparo de hipoclorito a 0,5% a partir de hipoclorito com 50% de cloro ativo**

Dados:

**VHS** = 2000 ml

% de cloro ativo do **Hd** = 50%

% de cloro ativo desejado = 0,5%

**Calculando** o volume necessário de hipoclorito disponível:

$$\text{volume necessário do Hd} = \frac{2000 \text{ ml} \times 0,5\%}{50\%} = \mathbf{20 \text{ ml}}$$

**Calculando** o volume de água a ser adicionado:

$$\text{Volume de água a ser adicionado} = 2000 \text{ ml} - 20 \text{ ml} = 1980 \text{ ml}$$



→ Portanto, para preparar 2000 ml de hipoclorito a 0,5% a partir de hipoclorito a 50% você precisa de 20 ml de hipoclorito a 50% + 1980 ml de água.

## **2 – Exemplo de aplicação da fórmula para preparo de hipoclorito a 2% a partir de hipoclorito com 50% de cloro ativo**

Dados:

**VHS** = 2000 ml

% de cloro ativo do **Hd** = 50%

% de cloro ativo desejado = 2%

**Calculando** o volume necessário de hipoclorito disponível:

$$\text{volume necessário do Hd} = \frac{2000 \text{ ml} \times 2\%}{50\%} = \mathbf{80 \text{ ml}}$$

**Calculando** o volume de água a ser adicionado:

**Volume de água a ser adicionado** = 2000 ml – 80 ml = 1920 ml

→ Portanto, para preparar 2000 ml de hipoclorito a 2% a partir de hipoclorito a 50% você precisa de 80 ml de hipoclorito a 50% + 1920 ml de água.

**OBSERVAÇÃO:** O hipoclorito de sódio deve ser guardado em frascos escuros, bem vedados e em temperatura ambiente. O hipoclorito deve ser preparado diariamente no volume necessário ao trabalho. Ao final do dia descarte as sobras diluídas em bastante água, na rede de esgoto do laboratório.

## Coleta, manuseio e transporte das amostras

### 1 – Coleta

Não é necessária a preparação especial do paciente antes de iniciar a coleta das amostras, mas recomenda-se um jejum de 8h.

O manuseio correto das amostras é imprescindível para proteger o RNA viral do HIV-1 de degradação.

- Coletar o sangue observando as precauções universais para punção venosa.
- Coletar o sangue em tubos estéreis contendo EDTA (k<sub>3</sub> 0,15% sol. V/V final)

OBS: Não usar tubos de EDTA com gel.  
Nunca utilizar tubos de coleta reciclados.

- Após a coleta, conservar as amostras por um período máximo de 4 horas a temperatura ambiente (18°C até 25°C). Não refrigere até a separação do plasma.
- Separar o plasma das células até 4h após a coleta por centrifugação a 1000Xg durante 15 min.
- Não submeta o plasma a processos de filtração ou centrifugação adicionais com o intuito de diminuir a turbidez.
- O plasma pode ser armazenado a -20°C por no máximo 72h. Caso as amostras não sejam processadas nesse período as mesmas devem ser armazenadas em freezer com temperatura de -60°C a -80°C.
- Armazenar o plasma em tubos estéreis, livres de RNAses e DNAses, com tampas rosqueáveis ou em microtubos de polipropileno.

⇒ No caso da metodologia Nuclisens HIV – 1 Qt processar conforme procedimentos padronizados utilizado para esta metodologia.

Recomenda-se que as amostras sejam estocadas em alíquotas, com quantidade suficiente para a realização dos testes, evitando assim o processo de congelamento/descongelamento das amostras.

⇒ Manuseie todas as amostras como potencialmente infectantes.

## 2- Transporte

Se for necessário o transporte das amostras (plasma) ao ponto executor, as mesmas deverão ser acondicionadas em caixas de isopor contendo gelo seco ou gelo reciclável em quantidade suficiente para manterem os plasmas congelados.

Assegure-se de que o empacotamento e a estocagem estejam de acordo com as regulamentações federais para o transporte de amostras clínicas e de agentes etiológicos .

### Importante

Cabe ao ponto executor a responsabilidade de dar treinamento e supervisão aos postos de coleta sobre o procedimento da coleta, separação do plasma, acondicionamento e transporte das amostras além de prover os mesmos de todos os insumos necessários à separação das amostras tais como ponteiras, microtubos, etc...

### Observação:

- Nunca enviar amostras às sextas-feiras, sábados e domingos ou vésperas de feriados, sem autorização do laboratório executor.

## Divisão da área física

- vide nova portaria da SAS/MS a ser publicada.
- a divisão da área física deverá ser respeitada pelas três tecnologias.

A alta sensibilidade das técnicas de biologia molecular pode representar um grave problema, caso algumas medidas de segurança e procedimentos especiais não sejam tomadas.

Quanto à organização física, o laboratório deve obedecer a determinadas regras básicas para evitar contaminações.

Deve-se tomar o cuidado de designar ambientes físicos separados, para as diferentes etapas envolvidas no preparo da reação.

O fluxo de trabalho deve ser unidirecional, iniciando-se na área de extração – isolamento e pré-amplificação (sala 1) ou área limpa e passando para a área de pós-amplificação - amplificação/deteção (sala 2) área de Biologia Molecular para evitar a contaminação do ambiente pelos amplicons.

Dessa forma, deverá existir um ambiente designado Somente para os procedimentos de preparo de reagentes e posterior preparo de amostras - liberação e isolamento dos ácidos nucléicos e pré-amplificação do RNA viral das amostras clínicas. Este ambiente deverá conter todos os materiais e equipamentos necessários para tal e eles não devem ser retirados deste ambiente e nem utilizados para outra finalidade que não esta.

Se o laboratório não possuir uma área distinta para a separação do plasma, a mesma área pré, poderá ser utilizada desde que contenha um fluxo laminar destinado para este procedimento.

A área pós ou de Biologia Molecular deverá estar destinada à amplificação e deteção do RNA viral.

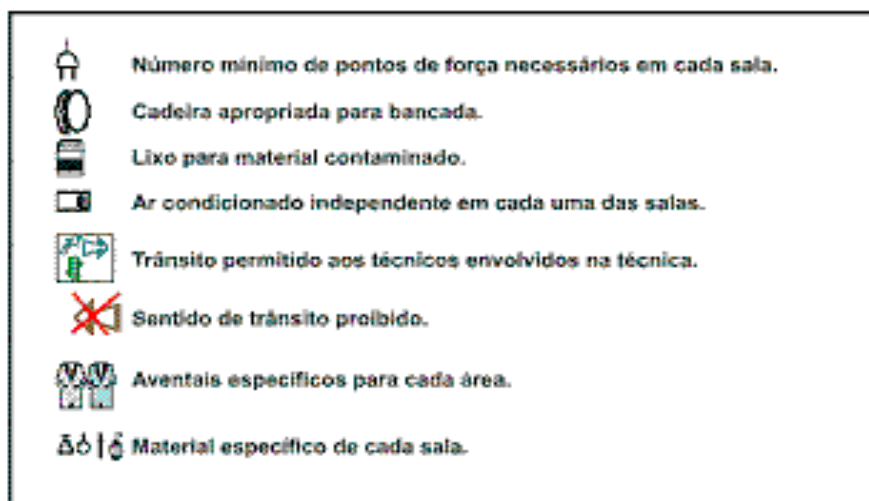
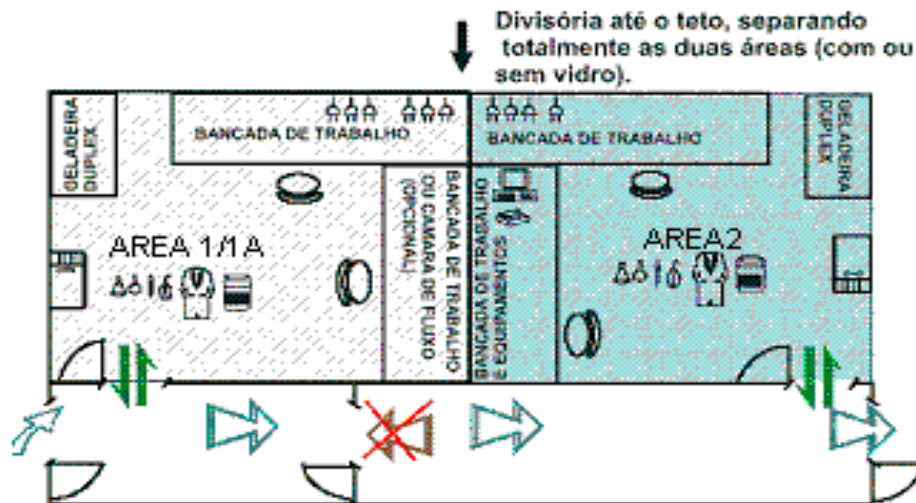
### ATENÇÃO

Os materiais e equipamentos devem ser exclusivos de cada área.

Equipamentos e materiais usados para o preparo dos reagentes não devem ser usados para preparo de amostras ou para pipetagem, processamento de ácido nucléico amplificado ou de outras fontes de ácido nucléico alvo.

É muito importante que jamais sejam trocados materiais e equipamentos entre um ambiente e outro, e que aventais, luvas, canetas e etc... utilizados em um ambiente não sejam em hipótese alguma levados para outra área.

## Disposição das Áreas



**Sala 1 – Área limpa, extração, isolamento, pré-amplificação**

**Sala 1A - Intermediária , preparo de Master Mix**

**Sala 2 – Área de Biologia Molecular, pós amplificação, detecção**

## Quantificação do RNA viral do HIV-1

Metodologias disponíveis na rede:

A quantificação da carga viral do HIV-1 pode atualmente ser realizada por três metodologias distintas, segundo os produtos de 3 empresas:

- bDNA → QUANTIPLEX HIV-1 RNA 3.0 Assay (BAYER DIAGNOSTICS)
- NASBA → NUCLISENS HIV-1 QT (BioMérieux)
- RT-PCR → AMPLICOR HIV-1 MONITOR (ROCHE)

Das três metodologias disponíveis, duas fazem a amplificação de forma direta, amplificando alvo e uma de forma indireta, amplificando sinal.

Comparações estatísticas revelaram estreita correlação (superior a 90%) entre os três ensaios. A análise da variação intratestes não revelou diferenças sistemáticas entre as duplicatas com nenhuma das três metodologias citadas, sugerindo boa reprodutibilidade das mesmas. Entretanto, como elas são baseadas em princípios diferentes, sugere-se que os resultados sejam comparados dentro do mesmo método.

Os princípios metodológicos dos três produtos disponíveis comercialmente encontram-se descritos na tabela abaixo.

PRODUTO	METODOLOGIA	REGIÃO GENÔMICA UTILIZADA	FAIXA DE DETECÇÃO (Cp/mL)	VOLUME DE AMOSTRA UTILIZADO (µL)
AMPLICOR HIV-1	RT-PCR	GAG	400 a 750.000	200
NUCLISENS HIV-1 QT	NASBA	GAG	80 a 10.000.000	1000
VERSANT HIV RNA 3.0 ASSAY	bDNA	POL	50 a 500.000	1000

## Contaminações

Para uma técnica de amplificação de ácidos nucleicos o termo contaminação pode assumir alguns sentidos diferentes:

### 1 – Contaminação do técnico pela amostra

→ toda e qualquer amostra de fluídos biológicos deve ser tratada como de potencial risco infeccioso.

### 2 – Contaminação de uma amostra para outra

→ no caso de uma técnica de amplificação, cuidados para não respingar amostras nas luvas, nas bancadas e em qualquer material, são essenciais. Todo material utilizado tem que ser novo e estéril, uma vez que a menor contaminação por outra amostra pode ser amplificada e gerar um resultado falso.

### 3 – Contaminação por enzimas degradantes do material a ser analisado

→ nas células vivas, uma das funções do DNA é codificar a seqüência das proteínas. A ligação entre o código genético e a proteína funcionante é o RNA. Assim a existência e degradação da molécula de RNA têm que ser controlada de alguma forma, pois enquanto o RNA estiver presente no citoplasma celular, aquela célula produzirá a proteína codificada por ele continuamente. Para controlar a existência do RNA, as células possuem uma enzima com função específica de degradar o RNA, a Rnase. Nas células vivas, esta enzima fica armazenada de forma inativa até que seja necessária sua utilização. Quando uma célula morre e se rompe, essa enzima se espalha na amostra. No cotidiano, isso não interfere em nada, mas em um teste que visa detectar e quantificar o RNA viral, esse fato assume uma grande importância. Assim todo o material utilizado tem que ser estéril e novo. Não é correto encostar as mãos sem luvas limpas em qualquer material (sempre que achar necessário passe uma solução de água sanitária diluída a 10% e/ou álcool etílico diluído a 70% nas luvas). Uma vez de luvas, deve-se evitar qualquer contato com a pele e cabelos para evitar contaminação das luvas e dos materiais a serem utilizados por Rnases provenientes de células rompidas presentes.

### 4 – Contaminação da amostra por material já amplificado – amplicons

→ depois de amplificado, passa a existir uma quantidade muito grande de DNA/RNA na amostra. Assim, o material amplificado deve ser tratado como altamente contaminante do ensaio e sendo assim deve ser manipulado em ambiente destinado especificamente a ele.

## **Referência Bibliográfica**

Lehninger, Albert Lester – Principles of Biochemistry.

Bulas e Manuais informativos: ABBOTT, Roche, Organon Teknica, Bio-Mérieux e Bayer.

Manual de Biossegurança – FIOCRUZ – 2000

Manual de Biossegurança do Ministério da Saúde – Coordenação Nacional de DST e Aids.

Manual de Carga Viral do Ministério da Saúde – Secretaria de Política de Saúde – Coordenação Nacional de DST e Aids - 1999.

The cell – ver autor

Bioética Biorrisco – Silvio Valle



## **Grupo Bayer**

Fundada em 1863 na Alemanha e presente no Brasil desde 1896, a Bayer consolidou-se como uma das mais importantes e respeitadas indústrias internacionais, oferecendo ao mercado uma ampla gama de produtos e serviços que abrangem os campos da saúde, alimentação (agricultura) e materiais inovadores (polímeros). Possui atividades nos cinco continentes, com mais de 350 empresas e representações, e cerca de 115.400 colaboradores, 2.700 só no Brasil.

A Bayer Health Care – Produtos Diagnósticos, atua com destaque neste segmento, ofertando testes confiáveis e precisos nas áreas de : Química Clínica, Hematologia, Hemostasia, Uroanálise, Imunologia, Sorologia e principalmente Biologia Molecular, com as técnicas de : LIPA (line in probe Assays)- usado na genotipagem do vírus da Hepatite C, TMA (amplificação mediada por transcrição) – usado na detecção da presença do RNA do vírus da Hepatite C, e a metodologia bDNA (branched DNA) teste de Carga Viral , empregado na quantificação dos vírus HIV, HCV e HBV.

Recentemente a Bayer adquiriu também a empresa Visible Genetics e passou a oferecer também os ensaios Trugene de Resistência do vírus HIV, através de sequenciamento genômico.

A Bayer Health Care participa do Programa Nacional da Rede de Laboratórios de Carga Viral desde 2002, estando presente em 23 laboratórios, disponibilizando o teste Versant HIV-1 3.0 para medição da Carga Viral.

É com muito orgulho que a Bayer participa deste Programa, reconhecido mundialmente e que têm propiciado a milhares de portadores do vírus HIV uma qualidade de vida melhor, além de manter sob controle esta importante epidemia.

Bayer S.A

## 1.bDNA –branched DNA

### bDNA HIV-1 RNA 3.0 ASSAY

A tecnologia do *branched DNA* é um ensaio de hibridação em fase sólida tipo sanduíche de ácidos nucleicos usando moléculas de DNA ramificadas(bDNA).

A amostra é tratada com reagente de lise e o material nucleico do vírus liberado é então hibridado em solução usando dois conjuntos de sondas oligonucleotídeas. Uma das sondas serve como sonda de captura (localizada na superfície dos poços da placa) que hibrida especificamente com o RNA do HIV e faz com que o RNA do HIV fique ligado à placa. A segunda sonda serve para fixar o RNA do HIV à placa e também para hibridar com um outro conjunto de sondas: pré-amplificadora e amplificadora (bDNA), a essa última se atribui a função de aumentar o nível de sinal da hibridação. As moléculas de bDNA atuam como amplificadoras por se ligar a uma sonda marcada com fosfatase alcalina. Desta maneira, o sinal gerado pelo complexo HIV RNA-sondas é amplificado para detecção e quantificação do RNA viral.

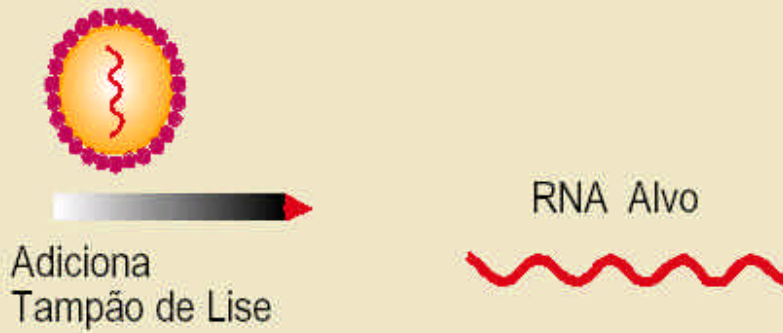
Finalmente, a adição de um substrato quimioluminescente reage com a última sonda e o sinal é lido em um luminômetro. A unidade relativa de luz (RLU) gerada é proporcional à quantidade de RNA do HIV na amostra.

As cópias de RNA do HIV são calculadas usando uma curva padrão gerada por um conjunto de seis calibradores e três controles HIV externos. A faixa de detecção de 50 a 500.000 cópias/mL apresenta linearidade em todo o intervalo.

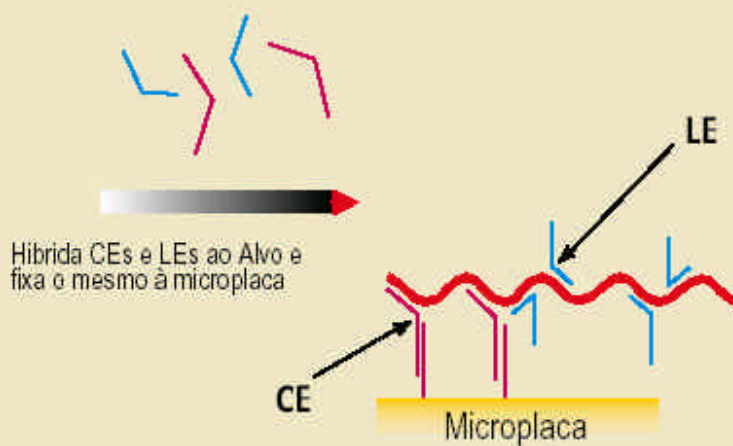
O bDNA é um ensaio overnight.

**Veja a seguir a reação ilustrada em seis diferentes etapas.**

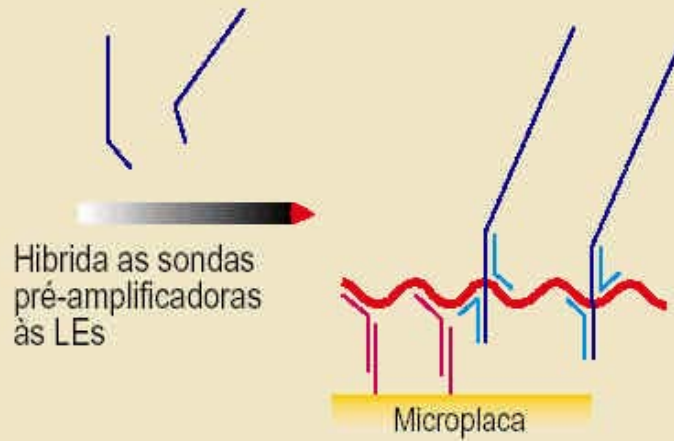
1. Rompe o vírus, degrada RNases,  
e libera o RNA



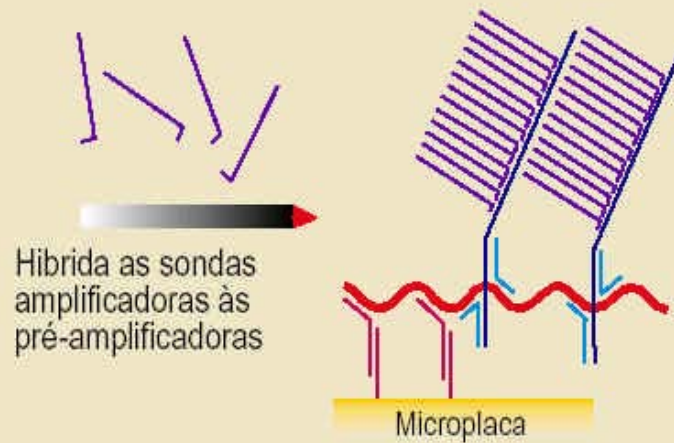
2. Sondas Alvo de Hibridação e Captura

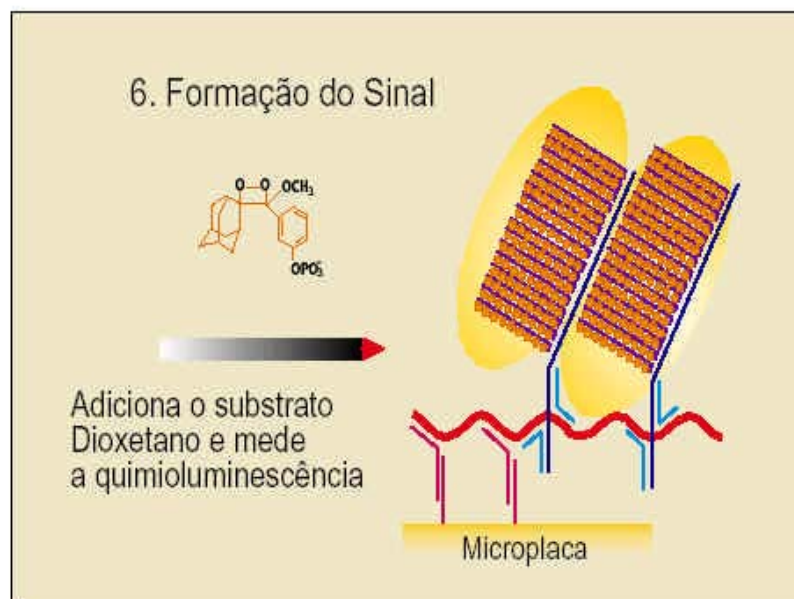
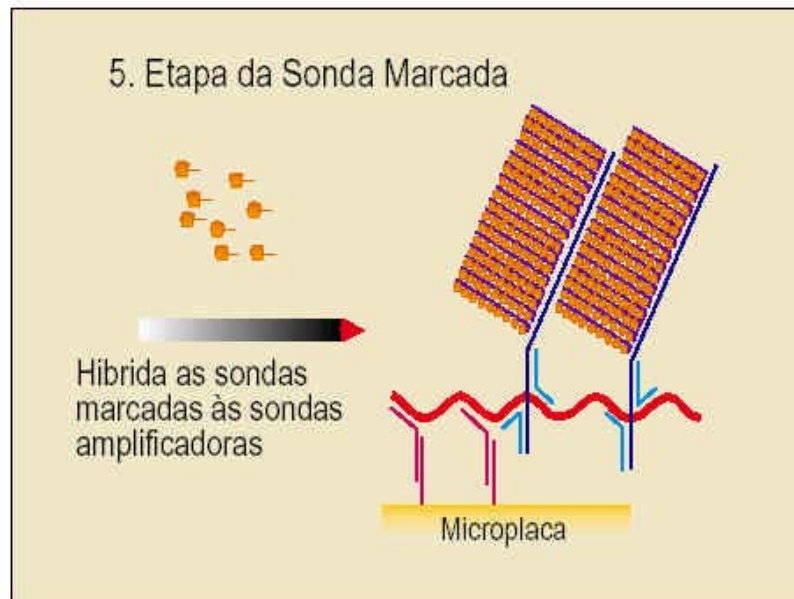


### 3. Etapa de Pré-Amplificação



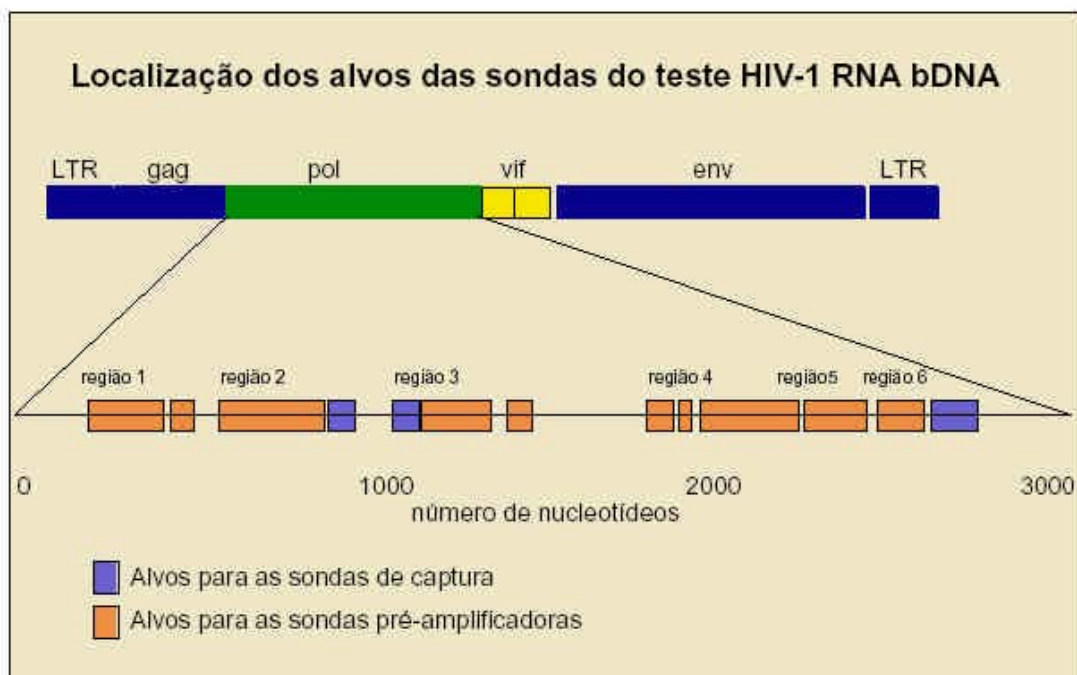
### 4. Etapa de Amplificação





## Localização das sondas do teste HIV-1

As sondas do sistema bDNA são dirigidas contra o **gene pol** do HIV-1



## 2. Apresentação dos Kits e Equipamento

### Bayer System 340 (bDNA Analyzer) & Data Management Software



Uma plataforma automatizada para os ensaios da linha branched DNA (bDNA), o System 340 simplifica os testes de diagnóstico molecular. A tecnologia bDNA capacita a detecção direta do ácido nucléico em plasma, e o System 340 realiza os ensaios de forma automatizada. Desenhado para laboratórios de médio e grande porte o System 340 realiza o processo da amplificação até a detecção do sinal. O software de gerenciamento de dados baseado em Windows fornece o mapeamento das placas, dados sobre o processo em geral e gera relatórios com os resultados finais.

## Características

- ❖ Automação – Reduz dramaticamente a manipulação, melhorando a eficiência operacional.
- ❖ Flexibilidade – Processa de 12 a 168 amostras simultaneamente.
- ❖ Checagem de erros – o sistema detecta automaticamente os erros ocorridos durante as operações e permite a intervenção do usuário uma vez os erros estejam resolvidos.
- ❖ Monitoramento automático da performance de qualidade, gerando relatório com tais dados.
- ❖ Esgoto reduzido – O system 340 gera poucos descartáveis e pouca quantidade de líquidos, reduzindo o custo com material contaminante.
- ❖ O System 340 gera todas as análises de dados, gráficos e curva padrão e controles.
- ❖ Os resultados são gerados em cópias/mL de acordo com a necessidade do usuário.
- ❖ Conectividade – os dados são gerados e podem ser exportados no formato .TXT ASCII, integrando-se com o sistema do laboratório.

## Especificações Técnicas

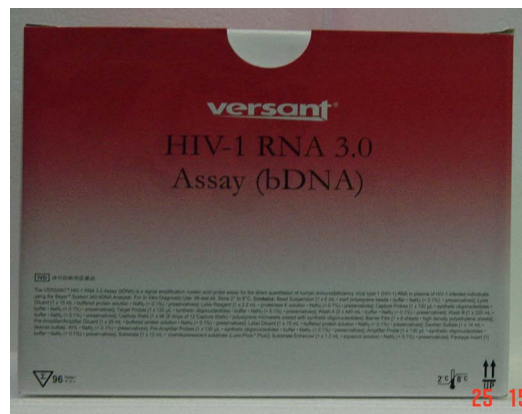
- ❖ Comprimento -100,3cm (39,5in)
- ❖ Largura - 68,6cm (27in)
- ❖ Altura - 45,4cm (17,9in)
- ❖ Peso - 68,0kg (150lb)
- ❖ Temperatura ambiente de operação - 18-30° C
- ❖ Humidade relativa do ambiente - 24-80%
- ❖ Categoria de instalação - II
- ❖ Grau de poluição - 2
- ❖ Voltagem - 100-120 ou 200-240 V - não bi volt.
- ❖ Freqüência - 50/60 Hz
- ❖ Potência - 400 VA máximo



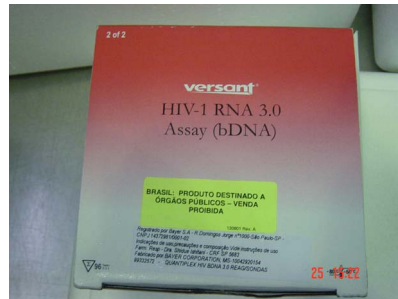
## Embalagens do Reagente HIV-1 RNA 3.0 bDNA

O Kit é composto de 2 caixas de reagentes

- **Caixa 1** com reagentes gerais: probes e tampões (armazenado em geladeira 2 a 8°C)



- **Caixa 2** contendo os padrões, controles e label probe (armazenado em freezer entre - 60 a - 80°C)



O laboratório deverá receber um conjunto de caixa 1 e caixa 2.



### 3. Material Necessário para Tecnologia bDNA

Abaixo uma relação de instrumentos necessários para a realização da técnica, com os descartáveis necessários.

#### **Materiais de consumo, equipamentos e acessórios fornecido pelo fabricante**

- Pipeta ajustável 20 mL até 200 mL
- Pipeta ajustável 200 mL até 1000 mL
- Pipeta sorológica de 2 mL
- Pipeta sorológica de 10 mL
- Pipeta multicanal (12 canais) ajustável.
- Termobloco (63+/- 0,5°C) com capacidade para 96 tubos de 1,5 mL
- Centrífuga refrigerada com rotor para 23500 g
- Agitador (Vórtex)
- Banho Maria
- Freezer de - 60 a -80°C
- Microtubo de 1,5 mL resistente à ultracentrifugação
- Containers para líquidos para multicanal - capacidade 120mL
- Tubos cônicos de polipropileno 15 mL
- Tubos cônicos de polipropileno 50 mL
- Ponteiras com filtro de 200 mL
- Ponteiras com filtro de 1000 mL
- Ponteiras de 200 mL
- Ponteiras de transferência estéril

#### **Materiais de consumo, equipamentos e acessórios não fornecidos pelo fabricante**

- Repipetador ou pêra para pipetas sorológicas
- Estantes para tubos e microtubos
- Banho-Maria para sala 2
- Agitador (Vórtex) para sala 2
- Geladeira para armazenamento de reagentes

## 4.Procedimentos para Realização do Teste

O procedimento de realização do teste consiste de três atividades principais :

- Preparação do precipitado viral
- Hibridação das sondas
- Detecção da luminescência produzida

### SALA 1

#### PREPARAÇÃO DOS PRECIPITADOS VIRAIS

- Usando luvas limpe todas as pipetas e a área de trabalho com álcool etílico 70%.
- Pré-refrigere a centrífuga e o rotor no Programa # 1(1000 RPM, 4°C e tempo Hold).
- Remova da Caixa #2(freezer) os padrões e controles.
- Descongele os padrões, controles rapidamente em água fria e corrente, homogeneize por inversão e no agitador Vórtex. Manter em banho de gelo durante o uso.
- Proceda da mesma maneira com as amostras caso estas estejam congeladas.

**NOTA:** Os padrões e controles devem ser preparados no dia em que for realizado o procedimento do ensaio.

Não utilize precipitados preparados e armazenados anteriormente.

tubos estéreis e marque-os com identificações de Amostras, Padrões, e Controles (os padrões A, E e F são utilizados em duplicata).

- Remova da Caixa #1 (geladeira) o reagente "Bead Suspension" e homogeneize por inversão.
- Adicione 50 µL em cada tubo .
- Adicione 1,0 mL de Amostras, Padrões e Controles nos respectivos tubos abrindo-os um a um com auxílio de gaze ou papel absorvente.
- Tampe firmemente, agite no Vórtex e coloque-os no rotor da centrífuga.

- Cuidadosamente retire os tubos da centrífuga.
  - Imediatamente abra o tubo com auxílio de uma gaze ou papel absorvente e aspire o sobrenadante usando uma pipeta de transferência estéril para cada tubo ou utilize uma bomba de vácuo.
- **Aspire com cuidado para evitar aspirar todo o sobrenadante**
- **Evite aspirar no lado em que se encontra o precipitado**
- Deixe aproximadamente 20 µL do sobrenadante para cada tubo.
  - Ressuspender o precipitado no agitador de Vórtex.

**NOTA:** Em caso de utilizar bomba de vácuo proceder da seguinte maneira:  
- Utilizar sempre uma ponteira nova para aspirar cada tubo.  
- Após a aspiração de cada paciente descartar a ponteira e realizar a limpeza da mangueira aspirando álcool etílico 70% por 3 vezes.

- Imediatamente congele os precipitados virais a  $-70^{\circ}\text{C}$  por pelo menos 30 minutos antes de continuar com o procedimento de ensaio.
- Os precipitados virais das amostras podem ser armazenados por até 4 semanas antes da execução do teste.

## **SALA 1**

### **LISE DOS PRECIPITADOS (PRIMEIRO DIA)**

Antes de iniciar a lise dos precipitados assegure-se que todo o procedimento de manutenção do equipamento foi executado com sucesso.

**NOTA :** Ligar o termobloco (SALA 2) um dia antes de iniciar a lise dos precipitados a fim de evitar o fluxo entre as salas 1 e 2 .

- Usando luvas limpe todas as pipetas e a área de trabalho com álcool etílico 70%.

Remova da Caixa # 1 do Kit na geladeira:

- Diluente de lise (Lysis Diluent) - Aqueça o diluente de lise em banho de 37°C por 10 a 20 minutos.
- Lise Reagente(Lysis Reagent),sonda de captura(Capture Probes), sonda alvo(Target Probes) - Mantenha na bancada até atingir temperatura ambiente.

### **Preparação Reagente de trabalho de Lise**

- Homogeneize o Diluente de Lise e o Reagente de Lise por inversão, e passe as Sondas Alvo e de Captura no agitador Vórtex.
- Prepare o Reagente de Trabalho de Lise em um tubo cônico de Polipropileno de 50 mL,conforme a tabela abaixo

Poços de Captura	Amostras	Diluente Lise	Reagente lise	Sondas Captura	Sondas Alvo (target)
08	84	14,1 mL	1,8 mL	100 µL	100 µL
04	36	7,1 mL	0,9 mL	50 µL	50 µL

- Homogeneize por inversão(10 vezes) e utilize o Vórtex de 05 a 10 segundos, depois inverta novamente 10 vezes.
- Conserve em temperatura ambiente e deixe diminuir a espuma formada. Descarte se não for utilizar dentro de 02 horas e meia.

**NOTA:** Para uma corrida com a placa inteira (84 testes), organize os precipitados das amostras, padrões e controles congelados em 02 sets de 48 testes cada.

- Remova o primeiro set de precipitados do freezer e deixe-o em temperatura ambiente por 05 minutos.
- Abra o tubo com auxílio de uma gaze ou papel absorvente.
- Adicione 120 µL do Reagente de Trabalho de Lise usando uma ponteira nova para cada tubo, tampe firmemente.
- Agitar no Vórtex por 10 segundos.
- **Transfira os tubos para sala 2**

## **SALA 2**

- Transferir os tubos para o termobloco e incubar a 63°C por 02 horas  
Repita o processo com os sets seguintes.

Remova da Caixa # 1 do Kit na geladeira:

- Wash A Solução de lavagem A(Wash A), Solução de lavagem B(Wash B) que serão utilizados no segundo dia.
- Poços de Captura(Capture Well) e mantenha em Temperatura ambiente.
- Uma vez completada 02 horas, remova os tubos do termobloco e homogeneize por inversão cada tubo para recuperar a condensação.
- Agite no Vórtex por 10 segundos.
- Deixe resfriar por 10 minutos em temperatura ambiente.
- Usando Luvas limpas, transfira os Poços de Captura para as placas metálicas do System 340.
- Pressione firmemente com cuidado cada tira de poços de captura e quebre a aba lateral.
- Observe que a Placa Metálica está entalhada para ser fixada para a esquerda.
- Coloque as placas na bandeja de orientação e mantenha coberta para evitar possível contaminação.

**NOTA:** Use sempre tiras de poços pretos para ocupar as fileiras onde não estão sendo realizados ensaios, caso não for executar nenhum teste na placa da direita preencha a mesma com poços pretos. **Não utilize tiras de poços quebrados**

- Usando luvas limpas coloque o filme selante em cada armação(pads). Observe se o filme selante e o de silicone estão firmemente presos à armação.
  - Transfira 100 µL das amostras, padrões e controles na placa conforme a lista de trabalho. Complete a placa da fileira A a H.
  - Programe o System 340 para receber as placas.
  - Coloque as duas placas nas bandejas de incubação.
  - Coloque a armação (pads) sobre cada placa.
  - Feche a porta de acesso e pressione START.
- O analisador automaticamente selará as placas e começará a aquecer para a temperatura de incubação overnight à 52°C.

Observe se o analisador mostra a mensagem "System is Maintaining Temperature" antes de deixar o sistema prosseguir com a incubação overnight.

**NOTA :**A incubação leva de 16 a 18 horas (não devendo exceder 18 horas para continuar o procedimento)



## SALA 2

### SEGUNDO DIA

➤ **NÃO PRESSIONE O BOTÃO START ATÉ QUE AS SEGUINTE ATIVIDADES TIVEREM SIDO COMPLETADAS:**

- Usando luvas, limpe todas as pipetas e a área de trabalho com álcool etílico 70%.
- Transfira o conteúdo de cada tampão de lavagem (A & B) para os respectivos recipientes no módulo de fluidos do System 340 de acordo com a tabela:

Poços de captura	Amostras	Tampão Lavagem A	Tampão Lavagem B
8	84	440 mL (1 garrafa)	320 mL (1 garrafa)
4	36	440 mL	120 mL

Remova da Caixa # 1 do Kit na geladeira:

- Diluente Pré-amplificador/Amplificador (único), Sulfato Dextran.

Aqueça o Diluente Pré-Amplificador/Amplificador, Sulfato Dextran em banho maria a 37°C por no mínimo 10 minutos.

- Sonda pré-amplificadora (manter temperatura ambiente).

Prepare o **Diluente de Trabalho Pré-Amplificador/Amplificador**, em um tubo de polipropileno de 50 mL de acordo com a tabela:

Poços de Captura	Amostras	Diluente Pre/Amplif	Sulfato de Dextran
8	84	21.0 mL	7.0 mL
4	36	12.3 mL	4.1 mL

**Nota:** Devido a alta viscosidade do Sulfato de Dextran a pipetagem deve ser feita devagar e cuidadosamente ,podendo ser utilizado repipetador com combtips livre de Dnase e Rnase descartáveis.

- Tampe o tubo e inverta 10 vezes e passe para o Vórtex por no mínimo 20 segundos.
- Coloque no banho à 37°C e deixe a espuma dissipar (aproximadamente 15 minutos). Descarte se não for usar dentro de 02 horas.

### **Reagente de Trabalho Pré-Amplificador**

- Prepare o Reagente de Trabalho Pré-Amplificador em um tubo de polipropileno de 15 mL de acordo com a tabela:

Poços de Captura	Amostras	Diluyente Trabalho Pre-Amplificador/Amplificador	Sonda Pré-Amplificadora
8	84	13.0 mL	100 µL
4	36	7.2 mL	55 µL

- Tampe o tubo e inverta por 10 vezes e passe no Vórtex por 20 segundos. Repita se necessário ate obter totalmente a homogeineização.
- Coloque no banho a 37°C até dissipar a espuma.
- Descarte se não for utilizar dentro de 30 minutos.
- **Mantenha o Diluyente de Trabalho Pré-Amplificador /Amplificador no banho a 37°C para uso posterior.**
- Apos a incubação overnight e quando os reagentes estiverem preparados, pressione o botão START do Analisador para que se inicie o resfriamento e lavagem das placas.

**NOTA:** O ciclo de lavagem/resfriamento do segundo dia leva aproximadamente 15 a 20 minutos dependendo da temperatura ambiente e do número de tiras a ser lavado. O equipamento automaticamente irá lavar e aspirar cada poço ,em seguida a placa será ejetada . Mantenha a placa na bandeja aquecida durante a adição do próximo reagente.

- Quando as placas forem ejetadas, **imediatamente** abra a porta
- Adicione 100 µL do Reagente de Trabalho Pré-Amplificador utilizando uma pipeta multicanal de 12. Carregue a placa da esquerda primeiro, da fileira A para H.
- Não permita que o tempo de pipetagem exceda 04 minutos
- Feche a porta e Pressione START.
- O equipamento incubará as placas por 30 minutos.
- Após a incubação o equipamento automaticamente resfriará as placas a 34° C e fará as seqüências de lavagem.

### **Reagente de Trabalho Amplificador**

- No início do ciclo de resfriamento/lavagem do Pré-Amplificador, remova a Sonda amplificadora da Caixa #1 e coloque-a na bancada (temperatura ambiente).
- Prepare o **Reagente de Trabalho Amplificador** em um tubo de polipropileno de 15 mL de acordo com a tabela:

Poços de Captura	Amostras	Diluyente de Trabalho Pré-Amplificador/Amplificador	Sonda Amplificadora
8	84	13.0 mL	100 µL
4	36	7.2 mL	55 µL

- Tampe e inverta o tubo no mínimo 10 vezes e passe no Vórtex por 20 segundos. Repita se necessário até obter totalmente a homogeneização.
- Coloque no banho a 37°C para dissipar a espuma.
- Descarte se não for utilizar dentro de 30 minutos.
- Quando as placas forem ejetadas, **imediatamente** abra a porta.
- Adicione 100 µL do Reagente de Trabalho Amplificador utilizando uma pipeta multicanal de 12. Carregue a placa da esquerda primeiro, da fileira A para H.
- Não permita que o tempo de pipetagem exceda 04 minutos.
- Feche a porta e pressione START.
- O equipamento incubará as placas por 30 minutos.
- Após a incubação o equipamento automaticamente resfriará as placas a 34° C e fará as seqüências de lavagem.

### Reagente de Trabalho Marcador (Label)

- Remova o Label Diluent da Caixa#1 do kit e coloque no banho a 37°C por no mínimo 10 minutos. Misture por inversão o recipiente varias vezes antes do uso.
- Remova a Sonda Marcada da Caixa #2 e descongele rapidamente em água corrente e homogeneize bem.

Imediatamente retorne a Sonda Marcada não utilizada ao freezer -70°C.

- No início do ciclo de resfriamento/lavagem Amplificador
- Prepare o Reagente de Trabalho Marcador em um tubo de polipropileno de 15 mL conforme a tabela:

Poços de Captura	Amostras	Label diluent Diluyente Marcador	Label probe Sonda Marcada
8	84	12.0 mL	100 µL
4	36	6.0 mL	50 µL

- Tampe e inverta o tubo por 10 vezes para homogeneizar.
- Mantenha em temperatura ambiente para a espuma dissipar.
- Descarte se não for utilizar dentro de 30 minutos
- Quando as placas forem ejetadas, **imediatamente** abra a porta.
- Adicione 100 µL do Reagente de Trabalho Marcador utilizando uma pipeta multicanal de 12. Carregue a placa da esquerda primeiro, da fileira A para H.
- Não permita que o tempo de pipetagem exceda 04 minutos.
- Feche a porta e pressione START.
- O equipamento incubará as placas por 45 minutos.
- Após a incubação o equipamento automaticamente resfriara as placas a 34° C e fará as seqüências de lavagem.

### Reagente de Trabalho Substrato

- No começo da Incubação de Marcação, remova da Caixa #1 o Substrato e o Substrate Enhancer do kit e coloque-os na bancada para atingirem a temperatura ambiente.

**Nota:** O substrato é susceptível à contaminação pela Fosfatase Alcalina.

Use luvas novas no manuseio deste reagente.

- Quando começar o ciclo de resfriamento/lavagem da Marcação
- Prepare o Reagente de Trabalho Substrato em um tubo de 15 mL de polipropileno conforme tabela:

Tiras de Captura	Amostras	Substrato	Substrate Enhancer
8	84	11.0 mL	1000 µL
4	36	5.5 mL	500 µL

- Tampe o tubo e inverta-o por no mínimo 10 vezes para homogeneização.
- Mantenha em temperatura ambiente
- Descarte se não for usar dentro de 30 minutos.
- O reagente de Trabalho Substrato deverá apresentar aspecto "leitoso".

**Mude o volume da pipeta multicanal para 80 µL.**

- Quando as placas forem ejetadas, **imediatamente** abra a porta
- Adicione **80 µL** do Reagente de Trabalho Substrato utilizando uma pipeta multicanal de 12. Carregue a placa da esquerda primeiro, da fileira A para H.
- Não permita que o tempo de pipetagem exceda 04 minutos.
- Feche a porta e pressione START.
- O equipamento incubará as placas por 30 minutos.
- Programe o DMS na função READ.

Após os 30 minutos de incubação o Analisador automaticamente lerá as contagens de luminescência RLU das placas e transferirá os dados para o arquivo DMS no computador. Será montada uma curva onde se poderá fazer análise crítica do comportamento dos Padrões, Controles e testes.

### **MANUTENÇÃO DO ANALISADOR APÓS CADA ENSAIO**

- Remova as placas do equipamento descartando as tiras de ensaio utilizadas, limpe as placas com álcool etílico 70%.
- Desmonte a armação selante descartando o filme, limpe com álcool etílico 70%.
- Esvazie e enxágüe os recipientes de lavagens A e B, complete com água destilada (preferencialmente água tipo I).
- Descarte o Lixo de acordo com as normas de Biossegurança do seu Laboratório.
- Guarde as placas metálicas, poços pretos, armação selante e barreira de silicone para o próximo ensaio.
- Pressione START.
- Aguarde.
- Após o término da lavagem, retorne ao menu principal.

**NOTA:** Caso mais de uma rotina seja processada durante a semana, pode-se manter o equipamento ligado.

Complete os recipientes de água e de solução de limpeza, pois a cada 4 horas será efetuado um prime no equipamento.

## 5.Procedimento para Operação dos Equipamentos

### 5.1-SYSTEM 340 & Data Management Software



System 340

Data Management Software

#### INICIALIZAÇÃO DO SYSTEM 340

- Ligar o equipamento
- Botão na parte posterior no canto inferior esquerdo
- Aguardar
- Pressionar a tecla START para execução do SELF TEST (Para verificação da parte mecânica e calibração PMT)
- Após o término do SELF TEST aparecerá a tela de Menu principal (MAIN MENU)



#### PROCEDIMENTO PARA PROGRAMAÇÃO DO ENSAIO

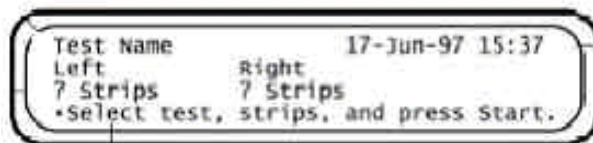
Partindo do **MAIN MENU**:



➤ Seleccione Test



➤ Seleccione Automated

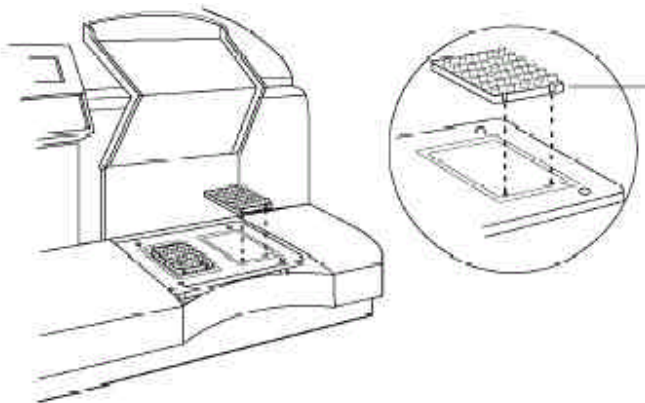


Selecione o teste

- Test name: HIV 3.0 (é a primeira opção)  
Caso não esteja selecionado HIV 3.0 utilize a tecla OPTIONS para selecionar
- Informe o número de tiras a serem utilizadas no ensaio na placa da esquerda e placa da direita ,utilizando a tecla OPTIONS

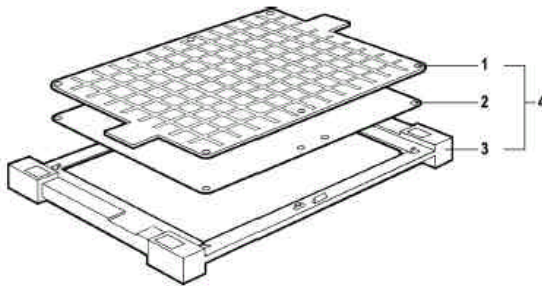
**OBS:** Se não estiver utilizando a placa da direita coloque **0**

- Em seguida pressione a tecla START
- O equipamento efetuará o Selftest
- Coloque as duas placas no equipamento





- Coloque as placas selantes (pads) previamente preparada (4) sobre cada placa



1.Barreira de silicone

2.Filme selante

3.Armação

- Feche a porta de acesso e pressione START

### **INICIALIZAÇÃO DO SOFTWARE**

- Ao ligar o computador pressione as teclas CTRL + ALT + DELETE
- Utilize:
  - usuário : **qdns**
  - senha : **Bayer**
- Ao abrir a tela clique duas vezes com o mouse no ícone DMS 340

### **NEW ID LIST**

Permite ao usuário a criação de uma **lista de trabalho**

- Selecione NEW ID LIST
- Selecione o teste **HIV 3.0** e clique ok
- Abrirá uma tela para cadastro dos pacientes a partir da posição B1
- Pode-se cadastrar até 84 pacientes por placa
- Salve esta lista em arquivo de memória com formato.dmL  
(Ex:25042002.dmL)
- Para imprimir esta lista de trabalho, abra o arquivo **File** e selecione **Print**

- Caso seja necessário a correção de alguma informação na lista de trabalho abra o arquivo **File**, selecione a lista de trabalho e altere os dados salvando novamente este arquivo sobre o já existente.

## **READ**

Permite ao usuário preparar o software para o recebimento da **leitura dos dados** enviados pelo SYSTEM 340.

- Selecione **Read**
- Preencha os dados da placa da esquerda
- Selecione o nome do teste
- Selecione a lista de trabalho a ser utilizada já previamente preparada no **NEW ID LIST**
- Coloque as informações: nome do operador, lote do kit, validade do kit e clique **OK**
- Introduza os valores das concentrações de padrões e controles que estão no suplemento de bula na caixa 2 no freezer.
- Verifique se os valores estão corretos e clique **YES**
- Crie um nome para o arquivo de resultados, utilizando o formato .dms (Ex:26052002.dms)
- Abrirá opção para o preenchimento de dados da placa da direita. Caso não esteja sendo utilizada clique em **NOT USED**
- O software emitirá uma mensagem na tela **WAITING FOR DATA**
- Após esta mensagem o software está habilitado para receber os dados enviados pelo equipamento.

## **FILE**

Permite ao usuário o gerenciamento dos arquivos gravados na memória do software e solicitar impressão.

## 5.2-EQUIPAMENTOS AUXILIARES

### CENTRÍFUGA REFRIGERADA



- Ligar a centrífuga na rede elétrica (verificar a voltagem correta do instrumento).
- Ligar o botão preto na frente do lado esquerdo do equipamento.
- Aparecerá na tela o último programa realizado.
- Antes de iniciar um ensaio limpe a centrífuga e o rotor com álcool etílico 70%.

#### Pré-refrigeração

- Pré-refrigere a centrífuga e o rotor utilizando o programa #1, no mínimo 15 minutos antes de preparar as amostras ou utilize o programa **Pre-Cool**
- Selecione o número 1 no display: aparecerá na tela 1000 RPM / 4°C / Hold.
- Selecione **START** com a seta na parte inferior do display.
- Automaticamente inicia-se o processo de centrifugação e aparecerá uma nova tela indicando **running , speed, time, temp.**
- Quando a temperatura estiver estabilizada selecione **STOP** com a seta na parte inferior do display.

## Preparação das amostras

- Para preparar as amostras utilize o programa # 2.
- Selecione o **número 2** no display :aparecerá na tela 17000 RPM / 4°C /01:00 hr.
- Selecione **START** com a seta na parte inferior do display.
- Automaticamente inicia-se o processo de centrifugação e aparecerá uma nova tela indicando **running ,speed, time, temp.**

A contagem de tempo é realizada de maneira regressiva, após o término de 1 hora soará um alarme e a centrífuga **PÁRA** automaticamente.

- Após o término da centrifugação, desligue o botão preto na frente do lado esquerdo do equipamento.
- Limpe a centrífuga e o rotor com álcool etílico 70%.

Feche a tampa somente quando a parte interna da centrífuga estiver **limpa e seca**.

## AGITADOR



- **Bivolt** - Ajustar a chave na parte posterior do equipamento.
- Ligar o agitador à rede elétrica (verificar a voltagem).
- Ajustar o botão de velocidade no número 9.
- Ajustar o botão de agitação em contínua ou periódica.
- Limpar o agitador com álcool etílico 70% em cada etapa da reação.

## TERMOBLOCO

- Bivolt- automático.
- Ligar no mínimo 15 minutos antes do uso.
- O equipamento está ajustado à temperatura fixa de 63°C.
- Possui 3 timers (T1 /T2 /T3) que estão ajustados com tempo fixo de 120 minutos.
- Selecione um dos timers
- Pressione a tecla T1 para disparar a cronometragem, o led acima da tecla acende indicando no display o tempo programado ( 1.2), pressione novamente para disparar a cronometragem, o led ficará **piscando**.
- Repita a operação acima para os outros timers T2 e T3.
- Após o término do tempo soará um alarme sonoro indicando no display qual dos timers (T1 / T2 / T3) decorreu o tempo.
- Pressione a tecla correspondente para parar de soar o alarme .
- Em caso de queda de energia ,uma bateria interna recarregável mantém os timers e o indicador de temperatura em funcionamento por um período de 4 horas.

### Manutenção:

- A limpeza do bloco do incubador deverá ser feita sempre que ocorrer o derramamento de líquidos.
  - Desligue o aparelho da tomada elétrica.
  - Com um swab limpo,umedecido em álcool etílico 70% fazer a limpeza das cavidades do bloco de alumínio ,utilize outro swab limpo e seco para terminar a limpeza.
- **Nunca utilize hipoclorito** para limpeza do bloco de alumínio, pois poderá provocar corrosão do mesmo.

## **BANHO MARIA**



- Ligar o banho maria à rede elétrica (verificar a voltagem ).
- Completar o volume com água destilada e ajustar o termostato para temperatura 37°C.
- Sempre verificar antes do ensaio a temperatura.

### **Manutenção:**

- Manter o banho sempre limpo.
- Completar o volume de água destilada sempre que necessário, evitando assim o aquecimento excessivo da resistência e consequente danificação.

## 6. Manutenção ,Limpeza e Desligamento do Sistema

### MANUTENÇÃO SYSTEM 340

- **ANTES DE INICIAR UM ENSAIO ou SEMANALMENTE caso o equipamento não esteja sendo utilizado**
- Clean System
- Realizar teste de Performance Checks
  - Detector
  - Dispense
  - Aspirate
  - Panel
- Verificar o-rings nas placas de ensaio
- Preparar solução de limpeza (**Hipoclorito a 0,2 %**)
- Limpeza dos frascos de lavagem e enxágüe
- Limpeza do frasco de resíduo
- Limpar a superfície externa do equipamento com álcool etílico 70%
- **MENSAL**
- Realizar teste de Performance Checks – Background
- **Quando necessário**
- Limpeza das agulhas do pente de lavagem

## 6.1-MANUTENÇÃO ANTES DE INICIAR O ENSAIO ou SEMANALMENTE

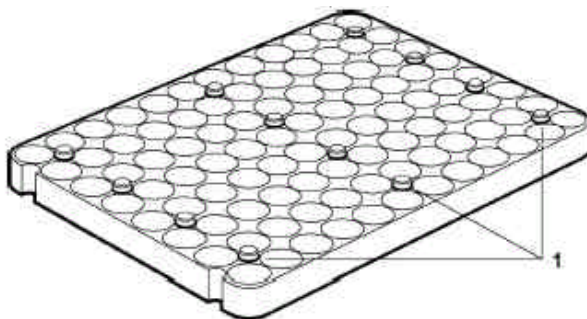
### 1.Preparação da SOLUÇÃO DE LIMPEZA

- Preparar uma solução de hipoclorito de sódio com concentração final de **0,2%** semanalmente.
- Verifique o teor de cloro ativo do hipoclorito de sódio
- **Ex** : - diluir 100 mL de hipoclorito comercial ( $\pm 2\%$ ) em 900 mL de água destilada ,dissolvendo os cristais totalmente antes do uso.

**ATENÇÃO:** Utilizar reagente de limpeza apropriado para laboratório de biologia molecular para limpeza de vidraria.

### 2.Verificar o-rings nas placas de ensaio

- Verifique os o-rings das placas de ensaio. Os o-rings prendem as tiras de poços de captura na placa.



1 O-rings



### 3.CLEAN SYSTEM

Partindo do **MAIN MENU**



- Selecione System Management



- Selecione Maintenance



- Selecione **Clean System**
  - Complete os frascos A / B / H<sub>2</sub>O e hipoclorito do módulo de fluidos com a solução de limpeza (0,2 %) recém preparada.
  - Selecione START
  - O equipamento efetuará a desinfecção de toda a tubulação
  - Após esta ação:
    - Enxágüe os frascos (A / B / H<sub>2</sub>O) com água destilada (preferencialmente Tipo I)
    - Complete volume com água destilada (preferencialmente Tipo I)
    - Selecione START
    - Após esta ação:
      - Enxágüe novamente os frascos A / B / H<sub>2</sub>O com água destilada (preferencialmente Tipo I) e complete novamente o volume com água destilada (preferencialmente Tipo I)

- Selecione START
- Terminado o Clean System, retorne a tela de **System Management** utilizando a tecla **Previous**.

#### 4.PERFORMANCE CHECKS

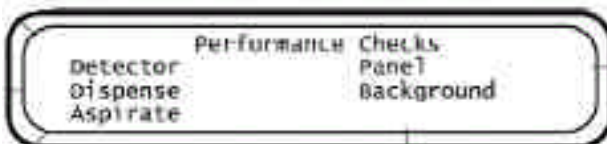
Partindo do **MAIN MENU**



- Selecione System Management



- Selecione Performance Checks



- **Selecione DETECTOR**

O equipamento efetuará teste de detecção ,verificando o dark count, que é um sinal eletrônico de fundo do tubo fotomultiplicador , e o desempenho da lâmpada interna de referência.

#### **Verifique os valores de leitura:**

- Dark Count with attenuation and Dark Count with no attenuation – menor que 300 – Temperatura ambiente entre 18 e 30 °C
- IRL Count with no attenuation – esteja entre 700.000 a 1.300.000
- Attenuation Factor – esteja entre 100 e 196

Selecione START

➤ **Selecione DISPENSE**

O equipamento efetuará teste de dispensação de soluções nas placas da direita e esquerda

- Complete as duas placas de ensaio com poços pretos
- Coloque na bandeja de aquecimento do equipamento
- Não coloque os PADS
- Selecione START

Após esta ação verifique visualmente se todos os poços estão preenchidos com água de maneira uniforme

➤ **Selecione ASPIRATE**

O equipamento efetuará teste de aspiração de soluções nas placas da direita e esquerda

- Complete as duas placas de ensaio com poços pretos preenchidos com água
- Coloque na bandeja de aquecimento do equipamento
- Não coloque os PADS
- Selecione START

Após esta ação verifique visualmente se todos os poços foram aspirados de maneira uniforme (o volume restante deve ser inferior a 15 ul)

➤ **Selecione PANEL**

O equipamento efetuará teste no : visor, indicador de erros, bips alto e baixo.

**Caso qualquer ação descrita não tenha tido uma boa performance  
NÃO INICIE O ENSAIO entre em contato imediatamente com a  
BAYER**

## 6.2-MANUTENÇÃO MENSAL

### 1.PERFORMANCE CHECKS - BACKGROUND

O equipamento efetuará teste de leitura nas placas da direita e esquerda

Programa o software na função READ para receber os dados das leituras

- Selecione READ.
- Preencha os dados da placa da esquerda.
- Selecione o teste **background**.
- Selecione a lista de trabalho **none**
- Coloque as informações solicitadas (nome do operador, lote do kit, validade do kit) e clique OK.
- Desconsidere os dados e clique ENTER
- Os valores estão corretos?
- Clique YES.
- Crie um nome para o arquivo de resultados. EX : backe250402.dms
- Abrirá uma opção para preenchimento e informação da placa da direita, da mesma forma que a placa da esquerda. Click OK.
- Crie um nome para o arquivo de resultados. EX : backd250402.dms
- O software emitirá uma mensagem na tela "WAITING FOR DATA".
- Após esta mensagem o software está habilitado para receber os dados enviados pelo equipamento.

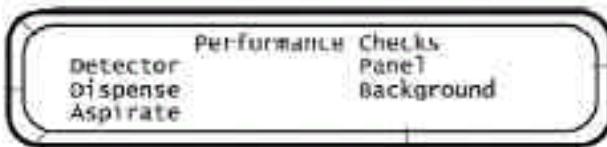
Partindo do **MAIN MENU**



- Selecione System Management



- Selecione Performance Checks



- Selecione **Background**
  - Complete as duas placas de ensaio com poços brancos
  - Coloque na bandeja de aquecimento do equipamento
  - Não coloque os PADS
  - Selecione START

O equipamento realizará a leitura de todos os poços e enviará automaticamente os dados para o computador

A leitura de cada poço deverá ser **inferior a 0,050 RLUs**.

Retorne ao Main Menu utilizando a tecla **Previous**.

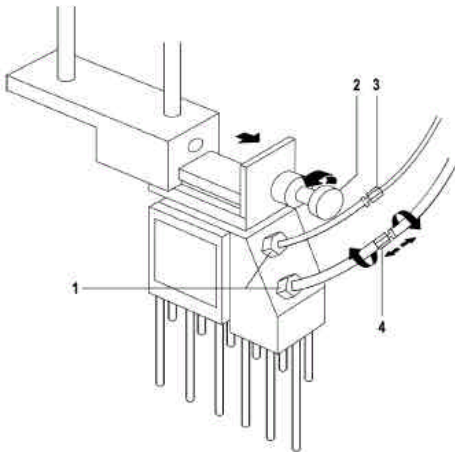
### 6.3-MANUTENÇÃO QUANDO NECESSÁRIA

Este procedimento pode ser realizado caso o equipamento apresente erro no **TESTE DE DISPENSAÇÃO/ASPIRAÇÃO**.

#### 1.Limpeza das agulhas do pente de lavagem

Partindo do **MAIN MENU** selecione:

- System Management
- Maintenance
- Service Read / Wash
- Abra a porta de acesso



- Solte os tubos do pente de lavagem (3 e 4)
- Desaperte manualmente o parafuso de fixação do pente (2)
- Deslize o pente para frente
- Insira uma linha de nylon em cada agulha
- Com auxílio de uma seringa injete **água destilada** e observe se há obstrução – repita esta etapa 2 vezes
- Instale o pente de lavagem
- Aperte o parafuso com a mão
- Conectar os tubos – certifique-se que estão bem encaixados
- Feche a porta de acesso
- Pressione START

## 6.4-Desligamento do Sistema

- Antes de desligar o SYSTEM 340 ,certifique-se que foi efetuado o procedimento de Clean System.
- Desligue o equipamento no botão na parte posterior do equipamento no canto inferior esquerdo.
- Caso seja efetuada mais de uma rotina durante a semana pode-se manter o equipamento ligado.
- Complete os recipientes de água e de solução de limpeza,pois a cada 4 horas será efetuado um prime no equipamento.

MANUTENÇÃO SYSTEM 340																														
MÊS	ANO																													
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Clean System																														
Detector																														
Dispense																														
Aspirate																														
Background																														
Limpeza Externa																														
Observações:																														
Responsável:																														



## 7.Procedimentos Básicos de Análise e Interpretação de Resultados

O teste é considerado válido se todas as condições abaixo forem cumpridas:

- As unidades relativas de luz (RLUs) para os padrões são média geométrica RLU Padrão A > RLU Padrão B > RLU Padrão C > RLU Padrão D > média geométrica RLU Padrão E > média geométrica RLU Padrão F.
- O Controle Negativo HIV-1 tem valor de < 50 cópias/mL.
- Os valores dos controles positivos HIV-1 estão dentro do intervalo especificado
- Revise essas instruções para certificar-se de que o teste foi realizado de acordo com os procedimentos recomendados pela Bayer.
- Certifique-se de que os padrões e controles estão na posição correta indicada no diagrama da placa.
- Certifique-se de que os reagentes estão dentro do prazo de validade.
- Certifique-se de que foi executada a manutenção obrigatória do System 340.

Utilize o seguinte critério para avaliar os resultados:

- O limite de detecção do teste é de 50 cópias/mL.
- As amostras com valores menores que 50 cópias/mL estão abaixo do limite inferior da quantificação do teste.
- As amostras com valores iguais ou maiores que 50 cópias/mL contêm HIV-1 RNA nas quantidades registradas.

Amostras com valores acima de 500.000 cópias/mL estão acima do limite superior da quantificação e podem ser diluídas (1/10) para obter um valor quantitativo.

**NOTA:** Dilua amostras em soro controle negativo Bayer HIV-1 RNA 3.0(bDNA). Teste novamente amostras diluídas e multiplique o resultado obtido pelo fator de diluição (X 10) para determinar o valor em cópias/mL de HIV-1 RNA no espécime original.

## Os resultados abaixo representam um laudo de ensaio HIV RNA 3.0 bDNA

QUANTIFLEX™ HIV RNA 3.0 Assay (bDNA)

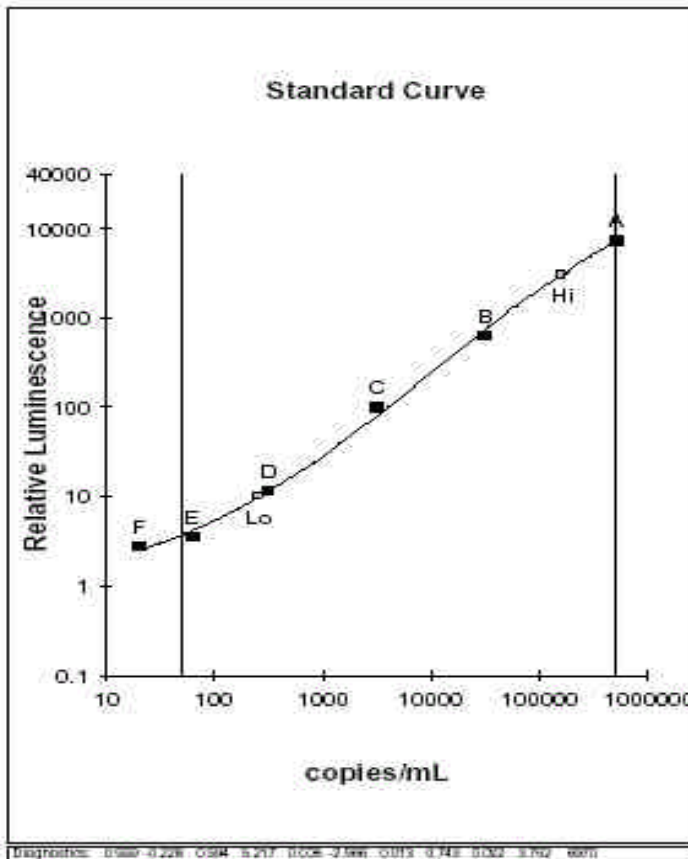
Software Version 4.0

Operator: carla ID List File: hiv121220...  
 Lot Number: z037 Expiration Date: 050702  
 Data File: hivbdna.DMS Collected: 12/13/01 11:04 LoR Tray

Relative Luminescence		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		2464	6204	628.8	99.50	11.80	3.517	3.689	2.651	2.900	2.241	9.967	3059
B		3.018	3.018	2.753	589.6	2.612	3.290	2.385	5.633	12.39	2.262	2.502	6643

Standards and Controls				Comments
Loc	ID	copies/mL	Avg RL	%CV
A1-2	Std A	513741	7246	21.3
A3	Std B	31615	628.8	
A4	Std C	3161	99.50	
A5	Std D	316	11.80	
A6-7	Std E	63	3.602	9.2
A8-9	Std F	20	2.773	6.3
A10	N-Ctl	0	2.241	
A11	Lo-PCtl	438	9.967	
A12	Hi-PCtl	55334	3059	

Pos Control Results	
	copies/mL
Lo-PCtl	254
Hi-PCtl	161977



QUANTIFLEX™ HIV RNA 3.0 Assay (bDNA)

Software Version 4.0

Data File: hivbdna.DMS      Collected: 12/13/01 11:04      Left Tray

ID List File: hiv121220...

Patient Specimens			Result		Comments
#	Loc	ID	Log Avg RL	copies/ml	
1	B1	1012331	3.018	< 50	
2	B2	1012340	3.018	< 50	
3	B3	1012358	2.753	< 50	
4	B4	1012366	589.6	24992	
5	B5	1012374	2.612	< 50	
6	B6	1012382	3.290	< 50	
7	B7	1015489	2.385	< 50	
8	B8	1015497	5.633	105	
9	B9	1015500	12.39	344	
10	B10	1015519	2.262	< 50	
11	B11	1012390	2.502	< 50	
12	B12	1472991	6643	465335	
13	C1				
14	C2				
15	C3				
16	C4				
17	C5				
18	C6				
19	C7				
20	C8				
21	C9				
22	C10				
23	C11				
24	C12				
25	D1				
26	D2				
27	D3				
28	D4				
29	D5				
30	D6				
31	D7				
32	D8				
33	D9				
34	D10				
35	D11				
36	D12				
37	E1				
38	E2				
39	E3				
40	E4				
41	E5				
42	E6				
43	E7				
44	E8				
45	E9				
46	E10				
47	E11				
48	E12				
49	F1				
50	F2				
51	F3				
52	F4				
53	F5				
54	F6				
55	F7				
56	F8				
57	F9				
58	F10				
59	F11				
60	F12				

QUANTIPLEX™ HIV RNA 3.0 Assay (bDNA)

Software Version 4.0

Data File: hivbdna.DMS      Collected: 12/13/01 11:04      L&R Tray

ID List File: hiv121220...

Patient Specimens			Result		Comments
#	Loc	ID	Log Avg FL	copies/ml	
61	G1				
62	G2				
63	G3				
64	G4				
65	G5				
66	G6				
67	G7				
68	G8				
69	G9				
70	G10				
71	G11				
72	G12				
73	H1				
74	H2				
75	H3				
76	H4				
77	H5				
78	H6				
79	H7				
80	H8				
81	H9				
82	H10				
83	H11				
84	H12				

## QUANTIFLEX™ Event Log

Software Version 4.0

Data File: hivbdna.DMS      Collected: 12/13/01 11:04      Left Tray

ID List File: hiv121220...

## Event Log

S	12Dec01 15:03	Test: HIV RNA 3.0
S	12Dec01 15:03	FMFT Calibration Results:
		+ Non-attenuated IRL count : 1050762
		+ Attenuated IRL count : 6801
		+ Non-attenuated dark count : 145
		+ Attenuated dark count : 135
		+ Attenuation factor : 157.6
		+ IRL adjustment factor : 0.95
S	12Dec01 15:04	Step: Load
S	12Dec01 15:04	Step: Timeout
S	12Dec01 15:05	Step: Timeout
S	12Dec01 15:05	Step: Incubate
S	12Dec01 16:24	Automatic fluid system rinse
S	12Dec01 22:25	Automatic fluid system rinse
S	13Dec01 02:25	Automatic fluid system rinse
S	13Dec01 06:25	Automatic fluid system rinse
S	13Dec01 07:31	Cooldown cycle activated
S	13Dec01 07:44	Cooldown cycle complete
S	13Dec01 07:44	Step: Wait
S	13Dec01 07:48	Step: Wait
S	13Dec01 07:48	Step: Timeout
S	13Dec01 07:48	Step: Prime
S	13Dec01 07:49	Step: Timeout
S	13Dec01 07:49	Step: Wash
S	13Dec01 07:49	Step: Prime
S	13Dec01 07:50	Step: Aspirate
S	13Dec01 07:50	Step: Timeout
S	13Dec01 07:50	Step: Load
S	13Dec01 07:53	Step: Timeout
S	13Dec01 07:53	Step: Timeout
S	13Dec01 07:53	Step: Incubate
S	13Dec01 08:23	Cooldown cycle activated
S	13Dec01 08:32	Cooldown cycle complete
S	13Dec01 08:32	Step: Wait
S	13Dec01 08:36	Step: Wait
S	13Dec01 08:36	Step: Timeout
S	13Dec01 08:37	Step: Prime
S	13Dec01 08:37	Step: Timeout
S	13Dec01 08:37	Step: Wash
S	13Dec01 08:38	Step: Prime
S	13Dec01 08:38	Step: Aspirate
S	13Dec01 08:38	Step: Timeout
S	13Dec01 08:38	Step: Load
S	13Dec01 08:40	Step: Timeout
S	13Dec01 08:40	Step: Timeout
S	13Dec01 08:41	Step: Timeout
S	13Dec01 08:41	Step: Incubate
S	13Dec01 09:11	Cooldown cycle activated
S	13Dec01 09:20	Cooldown cycle complete
S	13Dec01 09:20	Step: Wait
S	13Dec01 09:24	Step: Wait
S	13Dec01 09:24	Step: Timeout
S	13Dec01 09:24	Step: Prime
S	13Dec01 09:24	Step: Timeout
S	13Dec01 09:24	Step: Wash
S	13Dec01 09:25	Step: Prime
S	13Dec01 09:25	Step: Aspirate
S	13Dec01 09:26	Step: Timeout
S	13Dec01 09:26	Step: Load
S	13Dec01 09:28	Step: Timeout

QUANTIFLEX™ Event Log

Software Version 4.0

Data File: hrvbna.DMS      Collected: 12/13/01 11:04      Left Tray

ID List File: hiv121220...

Event Log

```

S 13Dec01 09:28 Step: Timeout
S 13Dec01 09:28 Step: Timeout
S 13Dec01 09:28 Step: Incubate
S 13Dec01 10:13 Cooldown cycle activated
S 13Dec01 10:22 Cooldown cycle complete
S 13Dec01 10:22 Step: Wait
S 13Dec01 10:26 Step: Wait
S 13Dec01 10:27 Step: Timeout
S 13Dec01 10:27 Step: Prime
S 13Dec01 10:27 Step: Timeout
S 13Dec01 10:27 Step: Wash
S 13Dec01 10:28 Step: Prime
S 13Dec01 10:28 Step: Timeout
S 13Dec01 10:28 Step: Prime
S 13Dec01 10:29 Step: Timeout
S 13Dec01 10:29 Step: Wash
S 13Dec01 10:30 Step: Prime
S 13Dec01 10:30 Step: Aspirate
S 13Dec01 10:30 Step: Timeout
S 13Dec01 10:30 Step: Load
S 13Dec01 10:32 Step: Timeout
S 13Dec01 10:32 Step: Timeout
S 13Dec01 10:32 Step: Timeout
S 13Dec01 10:33 Step: Incubate
S 13Dec01 11:03 Step: Wait
S 13Dec01 11:03 Step: Timeout
S 13Dec01 11:03 Step: Timeout
S 13Dec01 11:03 Step: Read
S 13Dec01 11:04 PMT Calibration Results:
+ Non-attenuated IRL count : 1049631
+ Attenuated IRL count : 6697
+ Non-attenuated dark count: 132
+ Attenuated dark count : 138
+ Attenuation factor : 160.0
+ IRL adjustment factor : 0.95
S 13Dec01 11:05 PMT Calibration Results:
+ Non-attenuated IRL count : 1049058
+ Attenuated IRL count : 6779
+ Non-attenuated dark count: 130
+ Attenuated dark count : 145
+ Attenuation factor : 158.1
+ IRL adjustment factor : 0.95

```

## **8. Problemas, Causas e Soluções na Realização dos Testes - Códigos de Erros do Equipamento**

### **Erro RS0031 – IRL factor out of range: ##### (Valor de leitura de referencia fora dos limites).**

- Este erro pode acontecer ao ligar o equipamento durante os testes iniciais ou durante um ensaio no momento da leitura. Este erro indica uma falha na leitura. O valor ideal para o IRL factor é 1.0. Porém esse fator fica normalmente calibrado entre 0.80 e 1.25. Valores acima de 1.40 e abaixo de 0.70 são críticos. Se esse erro acontecer ao ligar o equipamento, pode-se verificar visualmente o estado da cabeça de leitura, e caso necessário efetuar uma limpeza. Logo após efetuar o teste de leitura (Detector). Se acontecer durante uma rotina fatalmente o ensaio será perdido.
- Caso o erro permaneça entrar em contato com a Assistência Técnica Bayer.

### **Erro GA0221 – Slip detected (Erro de posição)**

- Este erro normalmente não cancela o ensaio. No arquivo de eventos ele aparece com um W o que indica apenas um aviso. Quando esse erro acontece o equipamento tenta novamente fazer o movimento, se tiver sucesso ele continua o processo. Caso não ele passa para o passo seguinte. Esse erro indica que o mecanismo de movimentação da cabeça de leitura/lavagem já está com desgaste. Sendo necessária intervenção técnica.
- Entrar em contato com a Assistência Técnica Bayer.

### **Erro AS0304 – No vacuum detected during prime (Falta de aspiração durante a lavagem)**

- Verificar se não está faltando as soluções necessárias para a lavagem. Verificar e se for necessário executar a manutenção na cabeça de lavagem.
- Caso o erro permaneça entrar em contato com a Assistência Técnica Bayer.

### **Erro CL0304 Frame/Pad pickup failure (Falta das placas selantes Pads)**

- Acontece quando não são colocados os pads para inicialização de um ensaio, e os sensores de detecção acusam a falta. Verificar se estão colocados corretamente e reiniciar o teste.
- Caso o erro permaneça entrar em contato com a Assistência Técnica.

### **Erro de Transbordamento nas Placas (Não há mensagem de erro)**

- Durante uma das fases de pipetagem é constatado visualmente que há transbordamento em uma ou nas duas placas durante um ensaio. Esse erro acontece quando pelo menos uma das agulhas de lavagem esta obstruída. Devido ao transbordamento o ensaio é perdido. Deve-se verificar a cabeça de lavagem, executar a manutenção necessária e executar novamente os testes de dispensação e aspiração (Dispense e Aspirate) por três vezes. Se for mais observado o transbordamento pode-se preparar um novo ensaio, porem por segurança é recomendado o uso de uma quantidade menor de amostra.
- Caso o erro permaneça entrar em contato com a Assistência Técnica Bayer.

**Qualquer outra mensagem de erro, por favor, entrar em contato com a Bayer.**



## 9. Contatos com a Bayer

Para entrar em contato com a Assistência Técnica ou Assessoria Científica utilize a **Central de Atendimento Diagnóstico-CAD**

**Telefones:**

**0800-129633**

**0800-7704004**

**(11) 5694-5621**

**(11) 5694-5963**

**[www.bayer.com.br/ds](http://www.bayer.com.br/ds)**

**Endereço:**

Rua Domingos Jorge, 1100

São Paulo –SP /Brasil

CEP 04779-900

## 10-Referências Bibliográficas

1. Collins ML, Irvine B, Tyner D, et al. A branched DNA signal amplification assay for quantification of nucleic acid targets below 100 molecule/mL. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:2979.84.
2. Kern D, Collins M, Fultz T, et al. An enhanced-sensitivity branched-DNA assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Micro.* 1996;34:3196.3202.
3. Cao Y, Ho DD, Todd J, et al. Clinical evaluation of branched DNA signal amplification for quantifying HIV type 1 in human plasma. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1995;11:353.61.
4. Iuliano R, Forastieri G, Brizzi M, et al. HIV-plasma viral load detection by branched DNA signal amplification. *New Microbiol.* 1995;18:299.301.
5. Operator's Manual. Bayer System 340 bDNA Analyzer and Data Management Software. Rev A 2003-09

A bioMérieux completou, em 2003, 40 anos de atividades especializadas na área do diagnóstico *in vitro* desenvolvendo, produzindo e comercializando produtos aplicáveis nos segmentos clínico e industrial.

Com mais de 5.300 colaboradores presentes em mais de 130 países incluindo o Brasil onde iniciou suas atividades em 1966.

**Segmento Clínico:**

Diagnóstico de doenças infecciosas, como HIV, Hepatites, Tuberculose, e infecções respiratórias, bem como, patologias, cardiovasculares e câncer, através de análise de amostras biológicas (sangue, saliva, urina).

**Segmento Industrial:**

Análise de amostras industriais (alimento, produtos farmacêuticos e cosméticos) ou amostras do meio ambiente (água, ar, superfície), para determinar sua qualidade microbiológica.

Líder mundial no segmento de microbiologia a bioMérieux apresenta, também forte presença nos segmentos de imunoensaios, hemostasia e biologia molecular.

Pioneira no fornecimento de testes de Carga Viral HIV para o Ministério da Saúde desde 2001 a bioMérieux é responsável pelo fornecimento de testes e suporte técnico para 33 laboratórios da Rede Nacional de Carga Viral para HIV.

A Partir de 2005 estaremos lançando novos produtos voltados para o segmento da Biologia Molecular.

-NucliSens miniMAG e NucliSens Magnetic Extraction Reagents: Dois inovadores e importantes produtos para extração de ácidos nucleicos capazes de efetivamente extrair tanto DNA quanto RNA. Oferecendo um alto nível de flexibilidade possibilitando testar diferentes tipos de amostras biológica (soro, plasma, sangue, líquido, fezes, escarro etc) e em diferentes volumes.

-NucliSens EasyQ: É o primeiro sistema automático que combina a metodologia NASBA de amplificação e a tecnologia “Real Time” de detecção molecular.

bioMérieux, fazendo do diagnóstico “in vitro” a semente par uma saúde melhor.

## 1. NASBA – Amplificação Baseada na Seqüência de Ácidos Nucléicos

O NASBA é um teste de amplificação de Ácido Nucléico utilizado para a quantificação de RNA de HIV-1 em plasma ou soro humano. Consiste em uma reação de amplificação isotérmica que ocorre a 41°C e pode gerar um fator de  $10^9$  cópias de RNA em 90 minutos.

A metodologia baseia-se na atividade simultânea de três enzimas: a Transcriptase Reversa (AMV), RNase H (*E. Coli*) e T7- RNA Polimerase e leva a amplificação da região correspondente ao gene *gag* do genoma do HIV-1 no RNA Viral alvo e nos calibradores (Qa, Qb e Qc).

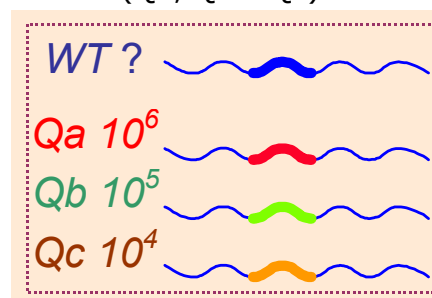


Figura 1. Calibradores internos e suas concentrações previamente conhecidas.

Os calibradores são três RNAs sintéticos adicionados à reação na fase inicial e servem de controladores internos. Distinguem-se do RNA de HIV-1 (tipo selvagem ou *WT*) em uma pequena seqüência de 20 nucleotídeos localizada no centro da região a ser amplificada. Durante todo processo, a amplificação do RNA alvo (amostra) é feita simultaneamente à amplificação dos três calibradores.

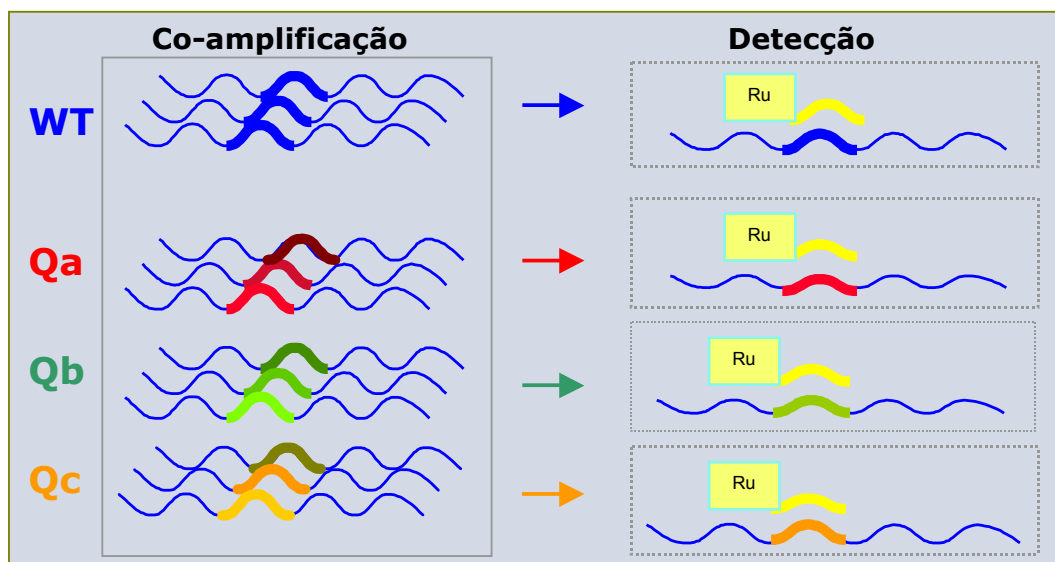


Figura 2- Esquema da co-amplificação do RNA alvo e dos calibradores e a detecção mostrando a hibridização com a sonda específica marcada com rutênio.

A revelação do resultado ocorre através da hibridização do ácido nucléico com sondas genéricas que contêm partículas magnéticas e sondas específicas, marcadas com rutênio. No interior do *NucliSens Reader* o material hibridizado é imobilizado na superfície de um eletrodo e uma voltagem é aplicada, desencadeando uma reação de óxido-redução padrão denominada eletroquimioluminescência (ECL). O sinal de ECL é quantificado e convertido em cópias por mililitro, pelo *software* do equipamento.

## SISTEMA NUCLISENS

O sistema *NucliSens HIV-1 QT* foi desenvolvido baseado na tecnologia NASBA, imitando *in vitro* o ciclo replicativo do HIV-1 *in vivo*. É um sistema completo de alta confiabilidade e sensibilidade capaz de detectar em uma única reação um valor de carga viral variável em uma faixa de 40 a 10.000.000 de cópias na amostra testada. A quantificação pelo Sistema NucliSens se desenvolve em três etapas e integra o sinergismo de três tecnologias chave:

- 1) Liberação e Isolamento do RNA viral- Tecnologia BOOM
- 2) Amplificação- Tecnologia NASBA
- 3) Detecção do Material Amplificado- Eletroquimioluminescência (ECL)

### **1.1 Liberação e Isolamento do RNA Viral (Tecnologia BOOM)**

#### **Amostra Clínica- Lise Celular:**

A reação começa com a adição da amostra clínica a um tampão de lise contendo Tiocianato de Guanidina e detergente Triton X-100. Este tampão solubiliza as proteínas e os lipídios, levando à inativação dos agentes infecciosos presentes na amostra. Desse modo, células e partículas virais são desintegradas, enzimas RNases e DNases são inativadas e o ácido nucléico é liberado.

Após a lise, os ácidos nucléicos permanecem estáveis no tampão por períodos extensos a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 14 dias em temperatura de 2 a  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  e por 48 horas em temperatura ambiente. No caso de necessidade de transporte o tampão de lise permite a remessa segura das amostras sob estas condições. As amostras em tampão de lise nunca devem ser armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **Amostra Clínica- Isolamento:**

Ao tampão de lise contendo o ácido nucléico liberado são adicionados os três calibradores internos Qa, Qb e Qc e partículas de sílica. A partir desta etapa inicia-se o processo de purificação do ácido nucléico. Qualquer ácido nucléico presente na amostra será, então, associado à sílica e imobilizado em fase sólida, permitindo a realização de sucessivas etapas de lavagens que eliminam por completo os materiais solubilizados presentes no sistema

(restos de proteínas lipídios e etc...). O resultado desta extração é um ácido nucléico altamente purificado e livre de fatores inibitórios.

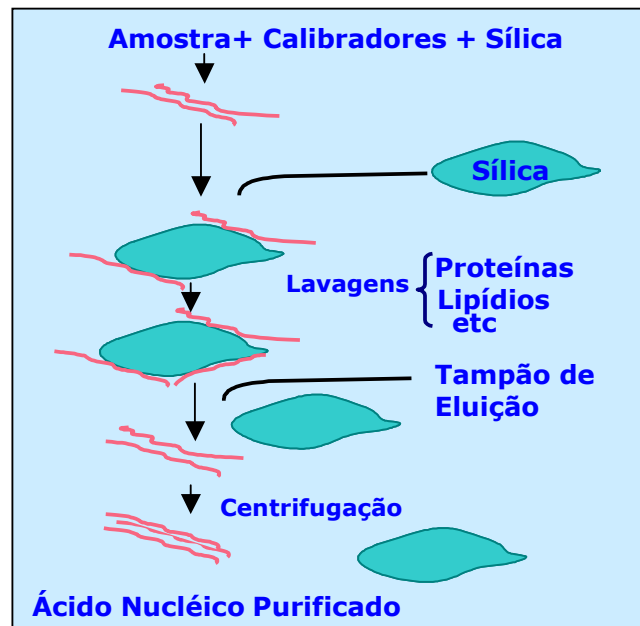
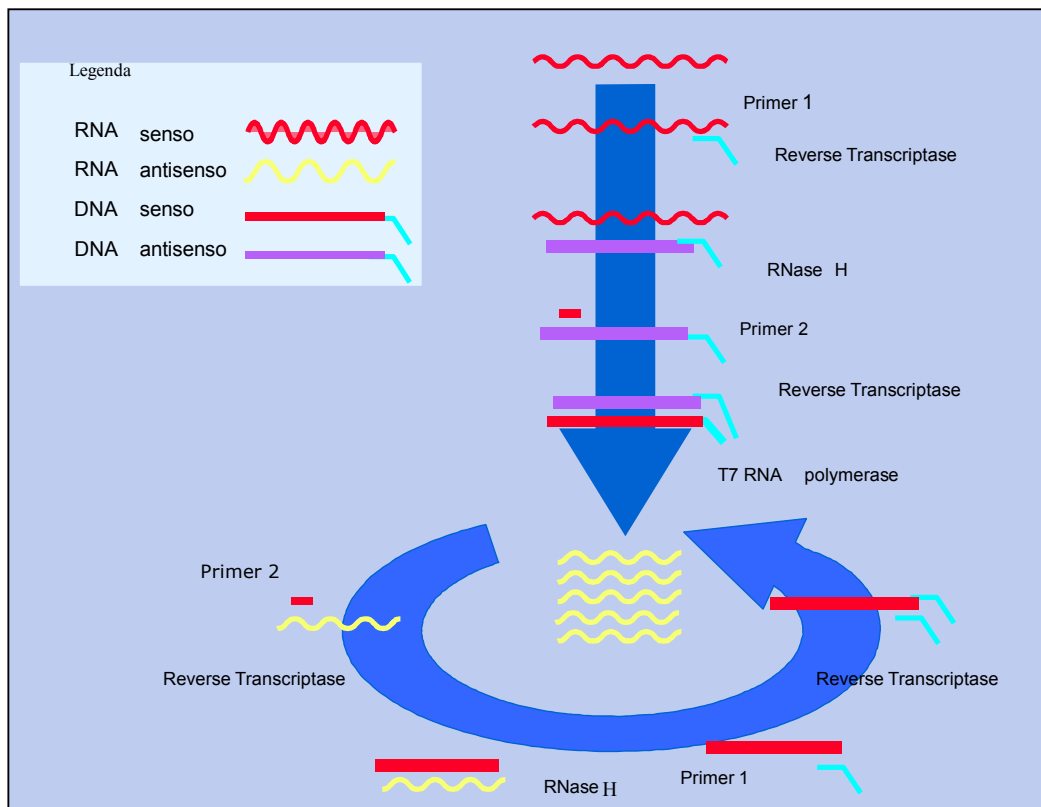


Figura 2- Representação esquemática da fase de liberação e isolamento do ácido nucléico- Tecnologia BOOM.

### 1.2 Fase de Amplificação NASBA

O processo é iniciado pelo anelamento de um primer oligonucleotídico (designado P1) à seqüência alvo. O primer P1 é projetado para que a porção 3' da seqüência seja complementar ao RNA alvo e a porção 5' codifique o promotor para a T7 RNA polimerase. Depois da ligação o primer é estendido pela ação da Transcriptase Reversa do vírus da Mieloblastose Aviária (AMV-RT), resultando numa cópia de cDNA da seqüência alvo de RNA. Na etapa seguinte a porção de RNA deste híbrido DNA/RNA é digerida pela RNase H. Dessa forma, a fita de cDNA torna-se acessível para o anelamento do segundo primer (designado P2). A enzima Transcriptase Reversa novamente é ativada e a segunda fita da cadeia de cDNA é sintetizada, gerando um cDNA de fita dupla com o sítio promotor da T7 RNA Polimerase íntegro, em uma extremidade. O sítio promotor íntegro é reconhecido pela T7-RNA Polimerase que é ativada, resultando na síntese de grandes quantidades de fitas negativas de RNA. A partir deste ponto inicia-se a fase cíclica da reação de amplificação NASBA, ou seja, as fitas negativas de RNA funcionarão como molde para a mesma via de reação descrita, entretanto, os primers se ligarão em ordem reversa: primeiro ocorrerá o anelamento de P2 e em seguida o anelamento de P1.



### 1.3 Detecção-Eletroquimioluminescência (ECL)

Na fase da detecção, alíquotas da amostra amplificada são adicionadas a quatro tubos contendo uma quantidade padrão de sondas específicas e genéricas. Em cada tubo ocorrerá uma reação de hibridização entre as sondas e o ácido nucléico, de acordo com a figura abaixo:

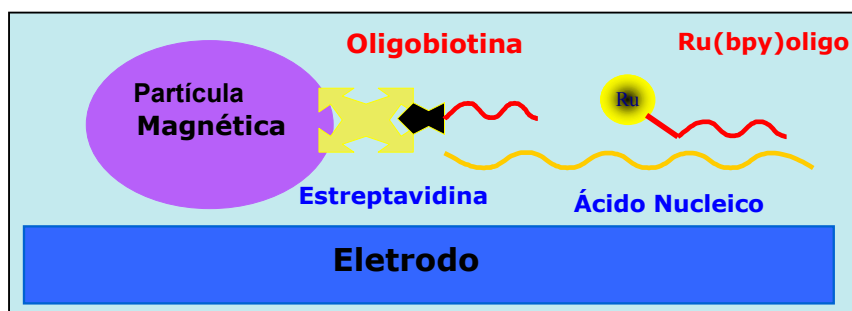


Figura 4- Representação esquemática do processo de hibridização entre as sondas e o ácido nucléico.

A sonda genérica é ligada a esferas magnéticas através do complexo biotina-estreptoavidina. Estas partículas são imobilizadas na superfície de um eletrodo que contém um ímã, durante o processo de quantificação do ácido nucléico (as partículas não hibridizadas e inespecíficas à reação são eliminadas após a passagem de um fluxo de tampão).

As sondas específicas são sintetizadas de acordo com cada seqüência dos 20 nucleotídeos internos dos RNAs (WT, Qa, Qb e Qc) e são marcadas com um átomo de rutênio ( $Ru^{++}$ ). O Rutênio na presença de um composto chamado Tripropilamina (TPA), sofre uma reação de eletroquimioluminescência (ECL) desencadeada após uma tensão elétrica gerada pelo eletrodo. Como consequência desta reação, ocorre a emissão de um photon de maneira que a quantidade de luz emitida por esta reação é proporcional à quantidade de amostra amplificada. No interior do *NucliSens Reader* essa luz é capturada pelo tubo fotomultiplicador (PMT) e convertida em um sinal digital que é interpretado pelo *software* do equipamento.

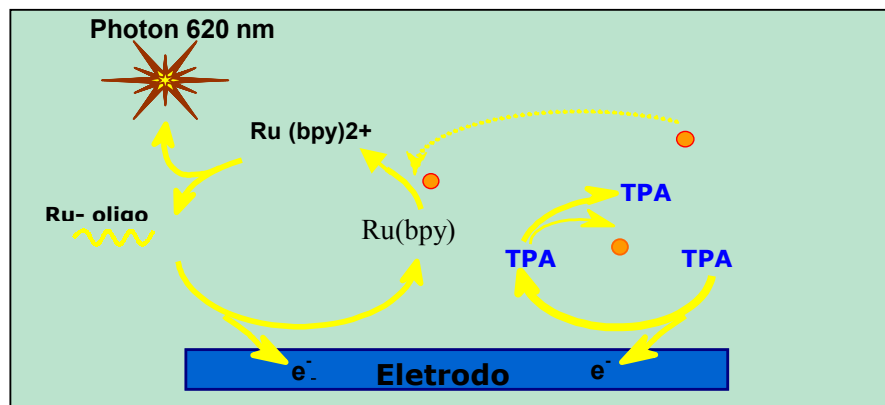


Figura 5- Representação esquemática da reação de Eletroquimioluminescência que ocorre no interior do tubo fotomultiplicador (PMT).

Após a emissão do sinal digital, o computador traça uma curva padrão utilizando os três calibradores (Qa, Qb e Qc). A partir dessa curva é calculada a concentração do RNA viral alvo (WT), e o resultado é fornecido em número de cópias por mililitro (cópias/mL), como no exemplo a seguir:

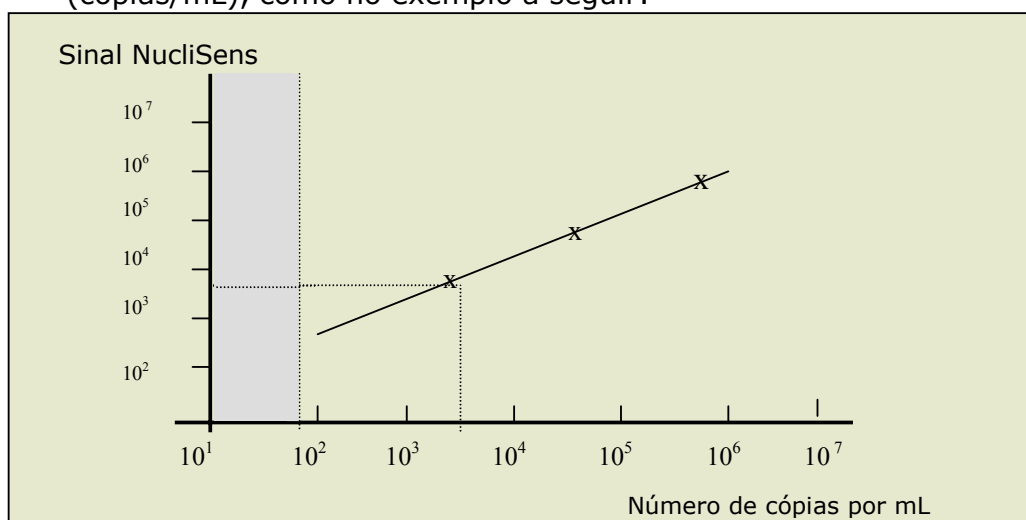
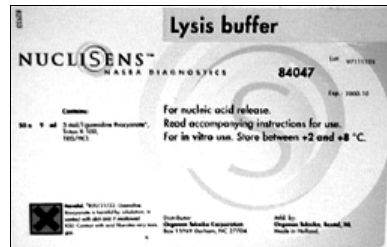


Figura 6- Representação esquemática do gráfico liberado pelo *software* do *NucliSens Reader*

## 2. Apresentação dos Kits e Equipamentos

### 2.1. Kit de Tampão de Lise:



#### **Embalagem e Conteúdo:**

❖ 50 unidades de tubos transparentes contendo 9,0 mL de tampão de lise cada, para uso individual.

**Transporte:** Deve ser feito de 2 a 30°C.

**Conservação:** Em Geladeira (4 a 8°C).

### 2.2 Kit de Isolamento:



#### **Embalagem e Conteúdo:**

❖ 05 unidades de microtubos contendo sílica - tampa transparente (Kit Manual e Automatizado).

❖ 05 unidades de microtubos contendo tampão de eluição - tampa branca (Kit Manual).

❖ 05 unidades de frascos transparentes contendo tampão de lavagem no (Kit Manual)

❖ 01 garrafa de 450 mL contendo tampão de lavagem (Kit Automatizado).

❖ 05 unidades de frascos de 60 mL contendo tampão de eluição (Kit Automatizado).

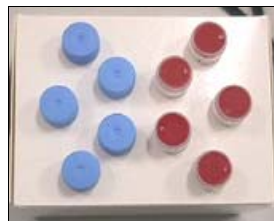
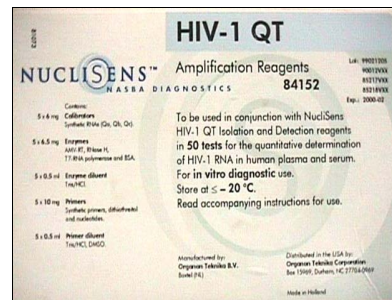
**Transporte:** Deve ser feito de 2°C a 30°C.

**Conservação:** o **Kit manual** deve ser conservado em -20°C, visto que em um tempo prolongado de armazenagem a 8°C poderia ocorrer



contaminação ao tampão de eluição, que não contém nenhum conservante. Por outro lado, o **Kit Automatizado** pode ser armazenado de 2°C a 30°C, pois este possui conservante para o tampão de lavagem impedindo sua contaminação.

## 2.3 Kit de Amplificação:



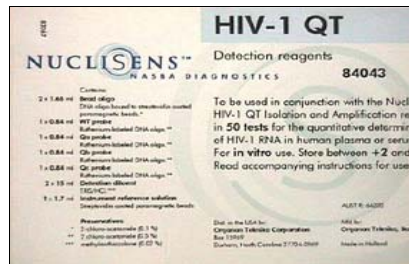
### Embalagem e Conteúdo:

- ❖ 05 unidades de microtubos contendo Diluente do Primer - tampa azul.
- ❖ 05 unidades de microtubos contendo Diluente das Enzimas - tampa vermelha.
- ❖ 05 unidades de microtubos contendo Primer - Sachet prateado contendo um microtubo de tampa azul. Possui uma esfera liofilizada.
- ❖ 05 unidades de microtubos contendo Enzimas - Sachet prateado contendo um microtubo de tampa vermelha. Possui uma esfera liofilizada.
- ❖ 05 unidades de microtubos contendo Calibradores – Sachet prateado contendo um microtubo de tampa amarela. Possui uma esfera liofilizada. **Usado na etapa de Isolamento.**

**Transporte:** 2°C a 30°C

**Conservação :** 2°C a 8°C

## 2.4 Kit de Detecção:



### Embalagem e Conteúdo:

- ❖ 01 unidade de microtubo contendo Sonda WT - tampa branca.
- ❖ 01 unidade de microtubo contendo Sonda Qa - tampa vermelha.
- ❖ 01 unidade de microtubo contendo Sonda Qb - tampa amarela.
- ❖ 01 unidade de microtubo contendo Sonda Qc - tampa azul.
- ❖ 02 unidades de microtubos contendo Oligopérolas - tampa rosa.
- ❖ 01 unidade de microtubo contendo Solução de Referência (RS) - tampa branca.
- ❖ 02 frascos contendo Diluente de Detecção.

**Transporte:** 2°C a 30°C

**Conservação :** 2°C a 8°C

## 2.5 Equipamento *Extractor*

O *Extractor* realiza a extração semi-automatizada dos ácidos nucléicos. Possui um complexo sistema hidráulico que realiza a purificação das amostras através de sucessivos processos de lavagens em tampão, etanol e acetona. O *Extractor*, realiza a eluição dos ácidos nucléicos em tampão apropriado, livre de sílica.

Componentes Básicos do Sistema :

- Unidade Principal
- Sistema Controle
- Impressora
- Bobina de Papel Térmico
- Cartuchos
- Suplementos
- Reagentes / Etanol & Acetona
- Esgoto
- Filtro de Vapor



## 2.6 Equipamento *NucliSens Reader*

O *NucliSens Reader* é responsável pela emissão dos resultados do sistema *NucliSens HIV-1QT*. Neste equipamento a luz (proveniente das reações de Eletroquimioluminescência - ECL) é convertida em um sinal digitalizado que é lido e interpretado pelo *software*. O resultado liberado é impresso em número de cópias por mL, juntamente com os valores dos sinais de ECL de todas as amostras. O *NucliSens Reader* também libera um gráfico padrão para cada amostra válida lida no equipamento.

Componentes Básicos do Sistema:

- Computador
- Impressora
- Carrossel
- PMT- Tubofotomultiplicador
- Magneto
- Eletrodo
- Agulha
- Compartimento para Tampão de ensaio
- Compartimento para Solução de Limpeza
- Esgoto



### **3. Materiais Básicos para a Tecnologia NASBA**

#### **3.1 Materiais de Consumo, Equipamentos e Acessórios Fornecidos pelo Fabricante**

- Centrífuga para microtubos com capacidade até 12.000RPM
- Ponteiras novas e estéreis com filtro: 0 - 20 $\mu$ L; 20 - 200 $\mu$ L; 200 - 1000 $\mu$ L
- Álcool 70% (preparado a partir de etanol absoluto Merck > 99,8 % art.100983)
- Acetona P.A.
- Dois (02) termoblocos ajustáveis
- Microtubos novos e estéreis (tipo eppendorf) de 1,5 mL
- Tubo de polipropileno de 12 x 75mm, com volume de 5 mL, novos
- Pipetas de transferência estéreis, para o isolamento manual
- Banho maria à 41°C
- Vórtex
- NucliSens Reader

#### **3.2 Materiais de Consumo, Equipamentos e Acessórios não Fornecidos pelo Fabricante**

- Centrífuga para tubos de 10mL com capacidade até 2.000 RPM
- Micropipetas ajustáveis de: 0 - 20 $\mu$ L; 20 - 200 $\mu$ L; 200 - 1000 $\mu$ L
- Capela de fluxo laminar vertical (opcional)
- Tubos cônicos tipo Falcon, de 50mL, novos e estéreis
- Luvas descartáveis
- Papel higiênico extra macio
- Timer
- Estantes para microtubos de 1,5mL
- Estantes para tubos de 15 mL
- Dois (02) termômetros de mercúrio
- Recipientes para coleta de material descartado
- Fita Crepe
- Equipamentos de proteção individual- EPIs (touca, máscara, propé, óculos, avental)

## 4. Procedimentos para a Realização do Teste

### 4.1 Procedimentos de uso do Kit *NucliSens HIV-1 QT*

#### SALA 1- Área de Liberação, Isolamento e Pré-amplificação do Ácido Nucléico



Equipamentos: Banho Maria\* a 37°C, Centrífuga Sorológica, pipeta P1000, estantes para tubo de 15 mL, estantes para microtubos.

*\*Verificar a temperatura antes de usar. Pelo menos uma vez por semana, checar com mais de um termômetro. Se houver dúvidas consultar a assessoria da bioMérieux Brasil S.A. e checar com um termômetro digital.*

Reagentes: Tampão de Lise NucliSens



Recomenda-se retirar da geladeira os tubos contendo o tampão de lise, 24 horas antes de começar a ser utilizado e mantê-lo a temperatura ambiente e protegido da luz. Esse procedimento facilita a dissolução dos cristais de Tiocianato de Guanidina.

Numerar os tubos com tampão de lise, na tampa e no rótulo.

Deixar o frasco a 37°C por 30 minutos para solubilizar totalmente os cristais de Tiocianato de Guanidina.

Agitar de vez em quando.

Centrifugar na centrífuga sorológica por 2 minutos a aproximadamente 2.000 rpm.

**⚠- SEMPRE CENTRIFUGAR OS TUBOS DE TAMPÃO DE LISE ANTES DE ABRÍ-LOS.**

## Procedimento :

1. Colher as amostras em tubos com EDTA, conforme procedimento básico.
2. Centrifugar a amostra para fazer a separação do plasma em até quatro horas após a coleta. O plasma deve ser fracionado em alíquotas, utilizando-se uma pipeta P1000 e uma ponteira de 1000 $\mu$ L com filtro. A amostra deve ser congelada imediatamente após a centrifugação.

### ATENÇÃO

- Se o plasma já estiver congelado, deixar descongelar em temperatura ambiente. Homogeneizar por inversão e centrifugar para retirar o material da tampa. Uma vez congeladas, as amostras só devem ser descongeladas na hora de serem testadas e não devem ser congeladas para nova utilização.
  - O ideal é colocar a quantidade de plasma a ser utilizada no teste dentro do tampão de lise para poder congelar. O tampão de lise mantém a integridade das amostras.
  - **As amostras em tampão de lise podem ser mantidas por 48 horas a temperatura ambiente, por 2 semanas na geladeira (2 a 8°C) ou por longos períodos a -70°C.**
  - **As amostras em tampão de lise não podem ser mantidas a -20°C.**
  - Os plasmas hemolisados, não devem ser utilizados, pois liberam RNase celular.
  - Os plasmas lipêmicos, podem ser utilizados sem problema, desde que sejam bem centrifugados.
3. Levar os tubos com tampão de lise e os tubos com as amostras centrifugadas para a área destinada ao isolamento.

4. Pipetar 1mL de cada amostra nos tubos com tampão de lise da seguinte maneira:

- Abrir os tubos de tampão de lise e manter as tampas encostadas em cima de cada um.
- Abrir o tubo da amostra, com auxílio de uma gaze ou papel absorvente em volta da tampa pois o vácuo de dentro do tubo pode gerar aerossol levando à contaminação entre as amostras.
- Apoie a tampa sobre o papel com a superfície contaminada da tampa voltada para cima.
- Utilizando a pipeta P1000 e uma ponteira de 1000 $\mu$ L com filtro (uma para cada amostra); **pipetar 1 mL da amostra**, retirar a tampa do tubo com tampão de lise e pipetar a amostra.
- **Fechar bem o tubo** com o tampão e a amostra e **descartar a ponteira**
- Fechar o tubo com a amostra e proceder do mesmo modo para todas as outras amostras.

**SEMPRE ABRIR UM TUBO DE AMOSTRA E O RESPECTIVO TUBO DE TAMPÃO DE LISE POR VEZ.**

5. Levar o tubo contendo o tampão de lise e as amostras ao vortex (lise viral).
6. Centrifugar por 2 min. a aproximadamente 2500 rpm.

## Isolamento:

### Equipamentos:

☒ Normal - Banho Maria\* a 37°C +/- 1°C, centrífuga sorológica, centrífuga para microtubos, termobloco\* aferido a 56°C +/- 1°C, vortex, pipeta P1000, pipeta P200, pipeta P20, estantes para tubo de 15 mL, estantes para microtubos.

**\*Verificar a temperatura antes de usar. Pelo menos uma vez por semana, checar com mais de um termômetro. Se houver dúvidas consultar a assessoria da bioMérieux Brasil S. A. e checar com um termômetro digital.**

☒ Bomba a Vácuo - Banho Maria\* a 37°C, Centrífuga Sorológica, centrífuga para microtubos, termobloco\* aferido a 56°C, vortex, pipeta P1000, pipeta P200, pipeta P20 e bomba a vácuo, estantes para tubo de 15 mL, estantes para microtubos.

**\*Verificar a temperatura antes de usar. Pelo menos uma vez por semana, checar com mais de um termômetro. Se houver dúvidas consultar a assessoria da bioMérieux Brasil S. A. e checar com um termômetro digital.**

Reagentes: Tampão de Lavagem, Calibradores\*, Sílica, Tampão de Eluição, Etanol 70% (verificar modo de preparo\*\*) e Acetona \*\*\*.

\* incluso no sachet prateado no kit de Amplificação.

## Preparar Material:

### **TAMPÃO DE LAVAGEM**

Recomenda-se a retirada da frasco da geladeira 24 horas antes de começar a ser utilizado, sendo mantido a temperatura ambiente e protegido da luz. Esse procedimento facilita a dissolução dos cristais de Tiocianato de Guanidina. Antes do uso, deixar o frasco a 37°C por 30 minutos para solubilizar totalmente os cristais. Agitar de vez em quando.

### **CALIBRADORES**

Sachet prateado **incluso no kit de Amplificação**. Dentro deste sachet existe um tubo com tampa amarela, com uma esfera liofilizada. Nessa esfera estão reunidos os calibradores Qa, Qb e Qc.

Caso a esfera esteja quebrada reconstitua como prescrito.

Caso a esfera sofra alterações de cor ou tamanho, contacte a empresa para troca da mesma.

**Pipeta e ponteiros** : Pipeta P1000 e uma ponteira de 1000 $\mu$ L ou pipeta P200 com uma ponteira de 200 $\mu$ L com filtro (neste caso pipetar 2 vezes 110 $\mu$ L, trocando a ponteira para não contaminar o tampão de eluição).

**Preparação** : Essa esfera liofilizada, deve ser reconstituída em 220 $\mu$ L do tampão de eluição **e ser levada imediatamente ao vortex.**

### **SÍLICA**

A sílica vem pronta para uso, mas deve ser levada ao vortex para homogeneizar

### **TAMPÃO DE ELUIÇÃO**

O tampão de eluição não precisa ser preparado, ele vem pronto para uso. Usado na preparação dos calibradores, e eluição das amostras.

### **\*\*ETANOL 70%**

**Especificações** : Deve ser preparado a partir de Etanol absoluto, grau P.A. (ACS), concentração mínima de 96%. Marcas Aprovadas- **MERCK** e **VETEC**

**Preparação da solução 70%** : O Etanol absoluto deve ser diluído em água Tipo1 (MilliQ), de preferência ou água de injeção. A diluição e as alíquotas devem ser feitas em tubo plástico, polipropileno, novo, tipo Falcon, graduado até 50mL. Ex.: Misturar 15mL de água com 35mL de etanol absoluto.

### **\*\*\*ACETONA :**

**Especificações** : ACETONA P.A. (ACS)

**Preparação** : Alíquotar em tubo de plástico polipropileno, novo e estéril tipo Falcon.

## **ATENÇÃO !!!**

Usar preferencialmente os tubos de polipropileno tipo Falcon. Estes tubos devem ser trocados no mínimo uma vez por semana para evitar contaminação. Recipientes de vidro contém sílica que pode reter ácidos nucleicos que podem contaminar a reação. Utilizar detergente apropriado para limpeza de vidraria de laboratório de Biologia Molecular (tipo Extran).

- ✓ **INSUMOS:** Microtubos, pipetas de transferência (e/ou ponteiros amarelas sem filtro), ponteiros de 1000 $\mu$ L com filtro, ponteiros de 200 $\mu$ L com filtro, ponteiros de 20 $\mu$ L com filtro, tubo de polipropileno, tipo Falcon de 50mL, gaze ou papel absorvente cortado previamente, descarte para ponteiros, descarte para líquidos **sem** hipoclorito e luvas.



**Microtubos** :Utilizando luvas limpas separar 10 microtubos de 1,5mL, fechá-los e numerá-los na tampa e na parede do tubo igualmente a numeração do tampão de lise. No caso de amplificação ser realizada logo em seguida, preparar mais 10 microtubos, da mesma maneira.

**Separar :**

- ✓ 70 pipetas de transferência (para quem usa bomba a vácuo nesta etapa, separar 10 pipetas de transferência e 60 ponteiras novas e estéreis sem filtro)
- ✓ 1 caixa de ponteiras de 1000 $\mu$ L com filtro
- ✓ 1 caixa de ponteiras de 200 $\mu$ L com filtro
- ✓ 1 caixa de ponteiras de 20 $\mu$ L com filtro
- ✓ Tubos de polipropileno, tipo Falcon de 50mL
- ✓ Gaze ou papel absorvente cortado
- ✓ Descarte apropriado para as ponteiras
- ✓ Descarte apropriado para os tampões
- ✓ Luvas

## Procedimento :

Antes de iniciar o procedimento recomenda-se abrir os tubos com auxílio de uma gaze ou papel absorvente e limpar os cristais na tampa ou na borda do tubo (cuidando para que os cristais não caiam na solução de lise pois isto poderia levar a problemas de amplificação ou invalidação de amostras). Recomenda-se utilizar gaze ou papel absorvente para abrir os tubos com tampão de lise em todas as etapas a seguir.

1. Utilizando a pipeta P20 e uma ponteira de 20 $\mu$ L com filtro, pipetar 20 $\mu$ L da solução contendo os calibradores reconstituídos (tubo de tampa amarela) em cada tubo de tampão de lise contendo amostra. **Trocar a ponteira a cada pipetagem.**
2. Utilizando a pipeta P200 e uma ponteira de 200 $\mu$ L com filtro pipetar 50 $\mu$ L de sílica, em cada tubo de tampão de lise contendo amostra e calibradores. Agitar o tubo de sílica no vortex a cada três pipetagens. **Trocar a ponteira a cada pipetagem.**
3. Tampar bem os tubos contendo amostra, calibradores e sílica, e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente, agitando a cada 2 minutos por inversão.
4. Centrifugar os tubos por 5 min. a aproximadamente 2500 rpm.
5. Abrir os tubos, **amostra por amostra**, retirar a espuma com uma pipeta de transferência ou bomba de vácuo, descartar a pipeta de transferência ou ponteira da bomba. Envolver a borda do tubo com uma gaze ou papel absorvente e descartar (por inversão) o sobrenadante em um recipiente apropriado. Utilizar a gaze/papel para limpar a borda do tubo. Fechar o tubo. **Trocar a pipeta de transferência ou ponteira da bomba a cada amostra.** Repetir o procedimento para cada amostra. Esse procedimento evita que resíduos na borda do tubo entrem em contato com as luvas, contaminando-as.

6. Abrir um tubo de amostra (sílica) de cada vez e utilizando a pipeta P1000 e uma ponteira de 1000 $\mu$ L com filtro, adicionar 1mL do tampão de lavagem. Fechar o tubo.
7. Repetir o procedimento para o restante das amostras. **Trocar a ponteira a cada pipetagem.**
8. Ressuspender totalmente a sílica no tampão de lavagem. Abrir o tubo e com o auxílio de uma pipeta de transferência, transferir todo o conteúdo para o microtubo numerado correspondente àquela amostra. Fechar o microtubo. Descartar o tubo de tampão de lise. **Trocar a pipeta de transferência.** Repetir o procedimento para cada amostra.  
Para os laboratórios que optaram por utilizar bomba de vácuo, proceder da seguinte maneira: utilizar sempre uma ponteira nova para cada paciente. Após aspiração de cada paciente, descartar a ponteira e proceder a limpeza da mangueira realizando aspiração com etanol 70% por 3 vezes.  
**ATENÇÃO :** Verificar se todos os microtubos estão fechados corretamente !!!

## 9. Trocar as luvas

10. Centrifugar os microtubos na microcentrifuga, por 30 seg. a 10000 rpm.
11. **Amostra por amostra**, abrir o microtubo com o auxílio de uma gaze ou papel absorvente, retirar todo o sobrenadante com uma pipeta de transferência ou bomba de vácuo, tomando cuidado para não perder sílica (se ficar mais do que 30 $\mu$ L de tampão a eluição e/ou a amplificação podem ser inibidas). **Trocar a gaze/papel absorvente e a pipeta de transferência ou ponteira da bomba a cada amostra.**
12. Utilizando a pipeta P1000 e uma ponteira de 1000 $\mu$ L com filtro, pipetar 1000 $\mu$ L de tampão de lavagem. Fechar o microtubo. Trocar a ponteira de 1000 $\mu$ L com filtro a cada amostra. Repetir o procedimento para cada amostra.
13. Levar os tubos ao vortex e agitar até que toda a sílica entre em suspensão.
14. Centrifugar por 30 seg. a 10000 rpm na microcentrifuga.
15. Repetir o item 11.
16. Repetir os passos 12,13 e 14, **substituindo** o tampão de lavagem pelo Etanol 70%.
17. Repetir a lavagem com etanol mais uma vez – itens 15 e 16.
18. Repetir os passos 11,12,13 e 14, **substituindo** o Etanol 70% por ACETONA.
19. **Amostra por amostra**, abrir o microtubo com o auxílio de uma gaze ou papel absorvente, retirar todo o sobrenadante com uma pipeta de transferência ou bomba de vácuo, tomando cuidado para não perder sílica (se ficar mais do que 30 $\mu$ L de tampão a eluição e/ou a amplificação podem ser inibidas). **Trocar a gaze/papel absorvente e a pipeta de transferência ou ponteira da bomba a cada amostra.**
20. Após retirar o sobrenadante do último microtubo, colocar todos os microtubos abertos no termobloco por 10 min. a 56°C. O tempo ideal é de 10 minutos. (Se após os 10 minutos a sílica não estiver totalmente seca, deixar a 56°C por mais 5 minutos. Normalmente 10 minutos são suficientes). Cobrir os microtubos abertos com uma gaze ou papel absorvente.

21. **Fechar os microtubos** e verificar se a sílica secou completamente. (Dar umas "batidinhas" no fundo do microtubo, o "pó" de sílica deve se soltar da parede do microtubo.

## 22. Trocar as luvas

23. **Amostra por amostra**, abrir o microtubo com o auxílio de uma gaze ou papel absorvente. Utilizando a pipeta P200 e uma ponteira de 200 $\mu$ L com filtro, pipetar 50 $\mu$ L de tampão de eluição. Fechar o microtubo. Trocar a ponteira de 200 $\mu$ L com filtro a cada amostra. Repetir o procedimento para cada amostra.

24. Depois de fechar o último microtubo, levar todos os tubos ao vortex.

25. Eluição - Incubar os microtubos no termobloco a 56°C, por 10 min. Após 5 min. retirar os microtubos (um a um) do termobloco, e levar ao vortex para manter a sílica em suspensão, depois voltar para o termobloco.

26. Centrifugar, na microcentrífuga, 5 min à 10.000rpm para a sílica depositar e o material ficar no sobrenadante.

### Obs:

- Sugerimos armazenar o sobrenadante com o pellet de sílica (no caso de isolamento manual) ou o eluído livre de sílica no caso de isolamento automatizado, como reserva a -20°C ou preferencialmente, a -70°C até a finalização do ensaio.

**Nessa fase a técnica pode ser interrompida. Chegamos ao final do isolamento dos ácidos nucléicos.**

### Importante

Os reagentes de Isolamento Automatizado NucliSens usados na extração de ácidos nucléicos através do equipamento Extractor, podem ser aplicados perfeitamente na extração de ácidos nucléicos pelo método manual.

Para isto, deve-se tomar o cuidado de fracionar o Tampão de Lavagem em alíquotas de 50mL. Essas alíquotas devem ser em frascos estéreis, por exemplo, em tubos Falcon de polipropileno. Esse cuidado é essencial para evitar posteriores contaminações do Tampão de Lavagem.

A Sílica se apresenta da mesma forma do Kit de Isolamento Manual não necessitando de nenhum cuidado específico.

Quanto ao Tampão de Eluição a única diferença está na sua apresentação. Ele se apresenta em um frasco de maior volume (60 mL), no entanto, também não será necessário nenhum cuidado específico.

Vale a pena lembrar, que se o kit de Isolamento Automatizado for armazenado em temperatura de 2 a 8°C (na geladeira), será necessário colocar o tampão de lavagem em Banho Maria a 37°C por 30 minutos, para retirar os possíveis cristais formados devido a sua composição (Tiocianato de Guanidina).

# Amplificação

Equipamentos: Termobloco\* aferido a 65°C +/- 1°C, termobloco\* aferido a 41°C +/- 0,5°C, vortex, pipeta P200, pipeta P20, banho Maria\* aferido a 41°C +/- 0,5°C (sala 2 - detecção), estantes para microtubos.

**\*Verificar a temperatura antes de usar. Pelo menos uma vez por semana, checar com mais de um termômetro. Se houver dúvidas consultar a assessoria da bioMérieux Brasil S. A. e checar com um termômetro digital.**

**REAGENTES:** Primers, Enzimas e Diluentes.

## Preparar Material

### PRIMERS

A esfera liofilizada, deve ser reconstituída com 120µL do diluente do primer.  
Levar imediatamente ao vortex e aguardar, até a total dissolução dos grânulos.

Caso a esfera esteja quebrada reconstitua como prescrito.

Caso a esfera sofra alterações de cor ou tamanho, contacte a empresa para troca da mesma.

### ENZIMAS

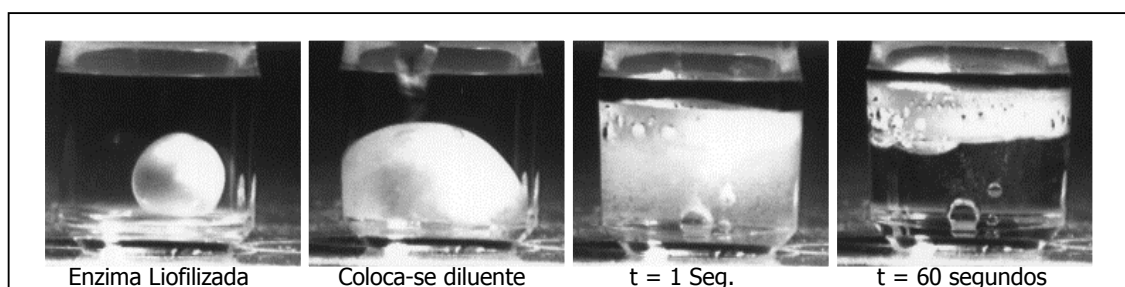
A esfera liofilizada, deve ser reconstituída com 55µL do diluente da enzima.  
Rolar o tubo entre os dedos delicadamente.

Aguardar 15 min. e centrifugar por 15 segundos (pulsar).

Caso a esfera esteja quebrada reconstitua como prescrito.

Caso a esfera sofra alterações de cor ou tamanho, contacte a empresa para troca da mesma.

⊗!!! **NUNCA VORTEXAR !!!** ⊗



**INSUMOS:** Microtubos, ponteiras de 1000µL com filtro, ponteiras de 200µL com filtro, ponteiras de 20µL com filtro, gaze ou papel absorvente cortado previamente, descarte para ponteiras e luvas.

- ✓ **Microtubos** : Se você iniciar a reação a partir desta etapa então numere os microtubos novos para realizar a amplificação, se não utilize os microtubos numerados no início da reação.
- ✓ 1 caixa de ponteiras de 1000 $\mu$ L com filtro
- ✓ 1 caixa de ponteiras de 200 $\mu$ L com filtro
- ✓ 1 caixa de ponteira de 20 $\mu$ L com filtro
- ✓ **Gaze** ou **papel** absorvente cortado
- ✓ **Descarte** apropriado para as ponteiras
- ✓ **Luvas**

**OBS :** **Ao receber uma remessa de Kits de Amplificação e Detecção certifique-se que os seis primeiros dígitos dos números de lote são iguais e os dígitos finais estão em seqüência, antes de iniciar a reação.**

## Procedimento :

**Antes de iniciar o procedimento verificar as temperaturas dos termoblocos.**

1. Utilizando a pipeta P20 e uma ponteira de 20 $\mu$ L com filtro, pipetar em todos os microtubos, 10 $\mu$ L de primer. Fechar todos os microtubos.  
\*Procedendo assim se usa apenas uma ponteira, pois os microtubos estão limpos.
2. Com o auxílio de uma gaze ou papel absorvente, abrir o tubo de isolamento e o tubo de amplificação correspondente. Sempre trabalhar com uma amostra por vez. **Neste passo, não abrir todos os tubos de uma única vez para evitar contaminação entre amostras. Se a amplificação for feita a partir de material isolado e congelado, deixar o material isolado descongelar a temperatura ambiente. Centrifugar os tubos a 10.000rpm por 5 minutos antes de utilizar.**
3. Utilizando a pipeta P20 e uma ponteira de 20 $\mu$ L com filtro, pipetar 5  $\mu$ L da amostra isolada, no tubo contendo o primer. Fechar o tubo contendo a sílica e o tubo de amplificação correspondente e descartar a ponteira. Repetir o procedimento para cada uma das amostras.
4. Incubar os tubos no termobloco a 65°C por 5 min.
5. transferir os tubos imediatamente para 41°C por 5 min.
6. Tirando os tubos de amplificação **(um de cada vez)** do termobloco a 41°C, pipetar a enzima nos tubos de amplificação. Abrir um tubo de amplificação por vez e utilizando a pipeta P20 e uma ponteira de 20 $\mu$ L

com filtro, pipetar 5 $\mu$ L de enzima. Fechar o tubo, homogeneizá-lo com a ponta dos dedos, e retornar o microtubo imediatamente para o termobloco, descartar a ponteira. Repetir o procedimento para cada uma das amostras. **Tomar o cuidado de ficar com os tubos fora do termobloco o menor tempo possível. NÃO RETIRAR TODOS OS TUBOS DO TERMOBLOCO DE UMA VEZ.**

7. Após pipetar a enzima no último microtubo, incubar por 5 minutos.
8. Centrifugar rapidamente após a incubação (dar um spin) e, **em até no máximo 5 min** levar os microtubos para o banho - Maria a 41°C, na sala de detecção. Incubar no banho - Maria 90min.
9. No caso de se fazer a detecção logo em seguida à amplificação, aproveitar para ligar o equipamento na seguinte ordem:
  - estabilizador
  - leitor
  - impressora
  - monitor
  - c p u

**OBS: O EQUIPAMENTO DEVE SER LIGADO 2HS ANTES DE SER USADO.**

10. Proceder para a detecção imediatamente ou armazenar o produto amplificado a -20 °C .

**OBS: NO CASO DE ARMAZENAMENTO DOS MICROTUBOS A -20°C OU A -70°C COM MATERIAL AMPLIFICADO, PROCEDER COM A DETECÇÃO SOMENTE ATÉ 1 MÊS**

**Nessa fase a técnica pode ser interrompida. Chegamos ao final da amplificação dos ácidos nucléicos.**

## SALA 2- Área de Amplificação e Leitura dos Resultados



EQUIPAMENTOS: Pipeta P1000, pipeta P200, pipeta P20, banho Maria\* aferido a 41°C +/- 0,5°C, estantes para microtubos.

*\*Verificar a temperatura antes de usar. Pelo menos uma vez por semana, checar com mais de um termômetro. Se houver dúvidas consultar a assessoria da bioMérieux Brasil S.A. e checar com um termômetro digital.*

REAGENTES: Sondas, Oligopérolas, Diluente de Detecção e Solução de Referência (RS), água para o equipamento.

## Preparar Material :

### **SONDAS E SOLUÇÃO DE REFERÊNCIA (RS)**

Não necessita ser preparado, pois já vêm pronto no kit. Não deve de modo algum ser usado gelado. Só deve ser pipetado na hora da leitura. Não pode ser colocado no banho-maria. Vortexar vigorosamente.

### **DILUENTE DE DETECÇÃO**

Em microtubos numerados para a detecção, pipetar a quantidade de diluente de acordo com a diluição especificada na caixa do Kit.

**O volume do diluente a ser usado na diluição é variável de lote para lote e deve ser feita conforme a indicação na caixa do kit.**

## **ATENÇÃO !!!**

Caso ocorra problemas relacionados com a diluição das amostras, ou seja, mensagem de erro ou aviso - detectar novamente com outro fator de diluição, isto significa que o fator de diluição deve ser ajustado para otimizar a técnica. Utilize a fórmula que segue:

**Novo fator de diluição = fator de diluição atual x sinal de Qb/150000**

## INSUMOS:

- ✓ *Microtubos*
- ✓ *Tubos de polipropileno de 5mL 12×75mm*
- ✓ *Ponteiras de 1000 $\mu$ L com filtro*
- ✓ *Ponteiras de 200 $\mu$ L com filtro*
- ✓ *Ponteiras de 20 $\mu$ L com filtro*
- ✓ *Tubos de polipropileno tipo Falcon de 50mL*
- ✓ *Gaze ou papel absorvente cortado*
- ✓ *Descarte apropriado para as ponteiras*
- ✓ *Fita Crepe*
- ✓ *Luvas*

## Procedimento :

1. Se você estiver começando a reação a partir deste passo, retirar o material amplificado do freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  e deixar a temperatura ambiente.
2. **Preparação das Soluções de Hibridização :**
  - Homogeneizar bem um dos tubos contendo oligopérolas (tubo rosa), nos dedos ou no vortex, antes de usar.
  - Separar 4 microtubos de 1,7 mL novos (um para cada sonda) e identificá-los como Wt, Qa, Qb e Qc, respectivamente.
  - Pipetar 130 $\mu$ L da oligopérola (tampa rosa) em cada um deles (pode-se utilizar a mesma ponteira).
  - Utilizando uma pipeta P200 e uma ponteira de 200 $\mu$ L com filtro pipetar 130 $\mu$ L da sonda WT (tampa branca) no microtubo identificado como WT. Descartar a ponteira.
  - Utilizando uma pipeta P200 e uma ponteira de 200 $\mu$ L com filtro pipetar 130 $\mu$ L da sonda Qa (tampa vermelha) no microtubo identificado como Qa. Descartar a ponteira.
  - Utilizando uma pipeta P200 e uma ponteira de 200 $\mu$ L com filtro pipetar 130 $\mu$ L da sonda Qb (tampa amarela) no microtubo identificado como Qb. Descartar a ponteira.
  - Utilizando uma pipeta P200 e uma ponteira de 200 $\mu$ L com filtro pipetar 130 $\mu$ L da sonda Qc (tampa azul) no microtubo identificado como Qc. Descartar a ponteira.
  - Homogeneizar bem cada um e reservar.
3. **Preparação das amostras:**
  - Preparar (numerar) um microtubo novo para cada amostra, para diluição das amostras amplificadas.
  - Pipetar o diluente de detecção com um volume "x" encontrado no rótulo da caixa de detecção (ex.: 200 $\mu$ L), em todos os microtubos.
  - Utilizando uma pipeta P20 e uma ponteira de 20 $\mu$ L com filtro, pipetar 5 $\mu$ L da amostra amplificada no microtubo correspondente contendo diluente



de amostra. Fechar o microtubo imediatamente e **trocar a ponteira** a cada pipetagem (Abrir ao mesmo tempo somente o tubo contendo a amostra amplificada e o tubo de diluição correspondente).

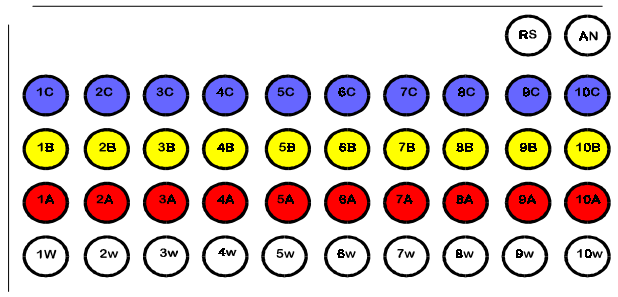
- Agitar o tubo de diluição recém preparado.

#### 4. Montagem dos tubos de leitura:

Separar 42 tubos de 12x75mm (exatos) de polipropileno, sendo 40 tubos para as amostras, 1 tubo para o AN e 1 tubo para o RS. Identificar os tubos da seguinte maneira :

- 1W, 2W, 3W, e assim por diante até 10W
- 1A, 2A, 3A, e assim por diante até 10A
- 1B, 2B, 3B, e assim por diante até 10B
- 1C, 2C, 3C, e assim por diante até 10C

Distribuir os tubos na estante conforme o esquema abaixo :



5. Utilizando uma pipeta P20 e uma ponteira de 20 $\mu$ L com filtro, distribuir as sondas :

- Pipetar 20 $\mu$ L da solução de hibridização contendo a sonda WT em cada um dos 10 tubos identificados como w# (# = número da amostra), na primeira fileira e no tubo de detecção identificado como AN. **Trocar ponteira.**
- Pipetar 20 $\mu$ L da solução de hibridização contendo a sonda Qa em cada um dos 10 tubos identificados como A#, na segunda fileira. **Trocar ponteira.**
- Pipetar 20 $\mu$ L da solução de hibridização contendo a sonda Qb em cada um dos 10 tubos identificados como B#, na terceira fileira. **Trocar ponteira.**
- Pipetar 20 $\mu$ L da solução de hibridização contendo a sonda Qc em cada um dos 10 tubos identificados como C#, na quarta fileira. **Trocar ponteira.**

6. Utilizando uma pipeta P20 e uma ponteira de 20 $\mu$ L com filtro pipetar 5 $\mu$ L da amostra diluída, em cada um dos tubos com numeração correspondente a aquela amostra. No total são quatro tubos de leitura, para cada amostra, cada um já contendo uma das 4 sondas de detecção (WT , Qa , Qb , Qc). Como as sondas são diferentes, **é necessário trocar de ponteira a cada tubo pipetado, mesmo sendo a mesma amostra.**

7. **Preparação AN** ( Tubo branco – **Assay Negative**):
  - Utilizando a pipeta P20 e uma ponteira de 20  $\mu$ L com filtro. Pipetar 20 $\mu$ L da sonda WT preparada ( oligopérola e sonda WT) em um tubo novo de 12x75mm de polipropileno.
  - Utilizando a pipeta P20 e uma ponteira de 20 $\mu$ L com filtro pipetar 5 $\mu$ L de diluente de detecção.
8. Cobrir todos os tubos com uma fita crepe.
9. Agitar toda a estante para homogeneizar bem, sem tirá-la da bancada, para evitar que o material se espalhe na parede do tubo. Quando não der mais para ver a “poeirinha” marrom no fundo dos tubos, a agitação foi suficiente.
10. Incubar todos os tubos na própria estante em banho-maria a 41° por 30 min., sendo que a cada 10 min. deve-se retirar a estante do banho-maria e colocá-la na bancada para agitar bem, voltando a estante para o banho. Essa incubação irá promover a hibridização.
11. Durante a hibridização, aproveite para checar o equipamento **READER**, realizar o **check flow rate**, o **back flush** (quando necessário) e **cadastrar a rotina** (verificar “procedimentos básicos de operação”).
12. Após os 30 min., retirar a estante do banho-maria, remover a fita adesiva. Cuidado: A cola da fita crepe pode ficar na borda dos tubos de hibridização.
13. Preparação da **SOLUÇÃO DE REFERÊNCIA (RS)**.
14. **Agitar vigorosamente o tubo contendo a Solução de Referência.** Utilizando a pipeta P1000 e uma ponteira de 1000 $\mu$ L com filtro pipetar 250 $\mu$ L Solução de Referência do kit em um tubo novo de 12x75mm de polipropileno identificado como **RS. ( O RS não pode ser incubado)**.
15. Aliquotar em um **tubo de polipropileno tipo Falcon de 50mL** aproximadamente 13mL de **Assay Buffer**. O **Assay Buffer** (Tampão do Teste) deve ser retirado do mesmo frasco que está sendo utilizado no aparelho.
16. Utilizando uma pipeta P1000 e uma ponteira de 1000 $\mu$ L com filtro pipetar 300 $\mu$ L do “Tampão de Teste” (Assay Buffer) em todos os tubos de amostra. Se não encostar nas paredes dos tubos, pode-se usar a mesma ponteira. Só utilizar a mesma ponteira se tiver total segurança. Caso o laboratório possua um repipetador, este poderá ser utilizado desde que as ponteiras utilizadas sejam livres de RNAses e DNAses.
17. O tubo **AN** também deve receber 300 $\mu$ L de tampão. **Não pipetar tampão no tubo RS.**
18. Colocar todos os tubos no carrossel do aparelho sendo que no n° 1, ficará o tubo RS, e no número 2 ficará o tubo AN. Do número 3 em diante, ficaram os quatro tubos de cada amostra em seqüência, totalizando 42 tubos no carrossel. Por exemplo:

# do Carrossel	Tubo
1	RS
2	AN
3	1WT
4	1Qa
5	1Qb
6	1Qc
7	2Qa
8	2Qb
.	.
.	.
.	.
42	10Qc

19. Proceder com a leitura (verificar "procedimentos básicos de operação").

**20. Após terminar a leitura fazer o Shutdown (verificar "procedimentos de manutenção do leitor NASBA"). A não realização deste procedimento pode acarretar problemas para o equipamento.**

21. Para desligar o equipamento proceda na seguinte ordem:

- Leitor
- Impressora
- Monitor
- CPU
- estabilizador

## AVISO!!!!

Para a realização do procedimento **BACKUP** das corridas realizadas no NucliSens Reader:

passo 1- Sair do sistema NucliSens através do comando **Routine/ Exit to DOS.**

passo 2- Escrever a palavra **compacta**

passo 3- Inserir o Disquete e apertar a tecla **enter** a todas as mensagens enviadas pelo software.

Desta forma, todos os seus arquivos serão enviados para o disquete e sua tela do computador ficará vazia.

Somente realizar o *back up* após a importação de todas as rotinas para o SISCEL

## 5. Procedimentos para Operação dos Equipamentos



NUCLISENS®  
NASBA DIAGNOSTICS



BIOMÉRIEUX

EXTRACTOR

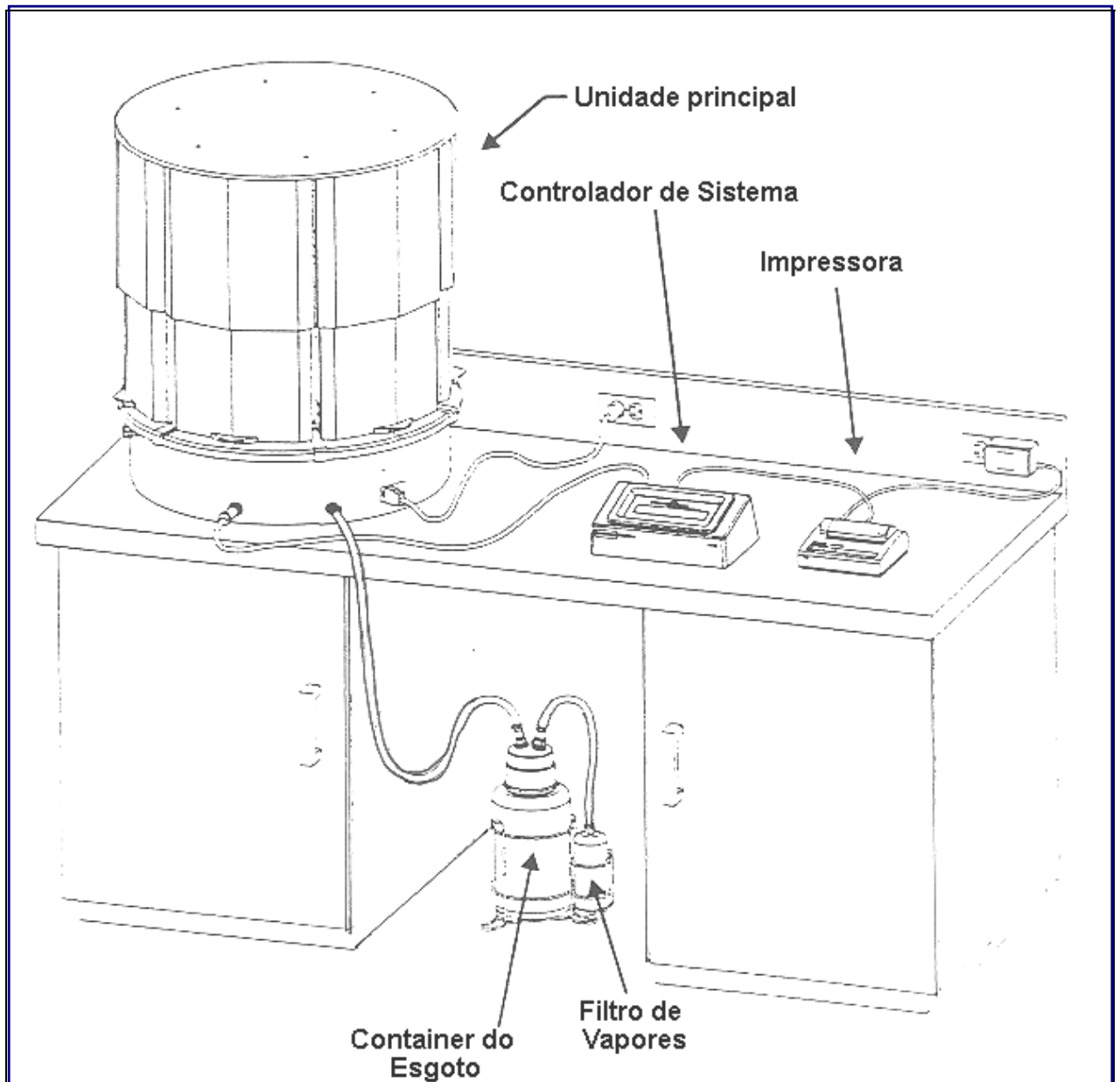
Nucleic acid diagnostics

### 5.1 Descrição de Operação do Equipamento NucliSens® Extractor:

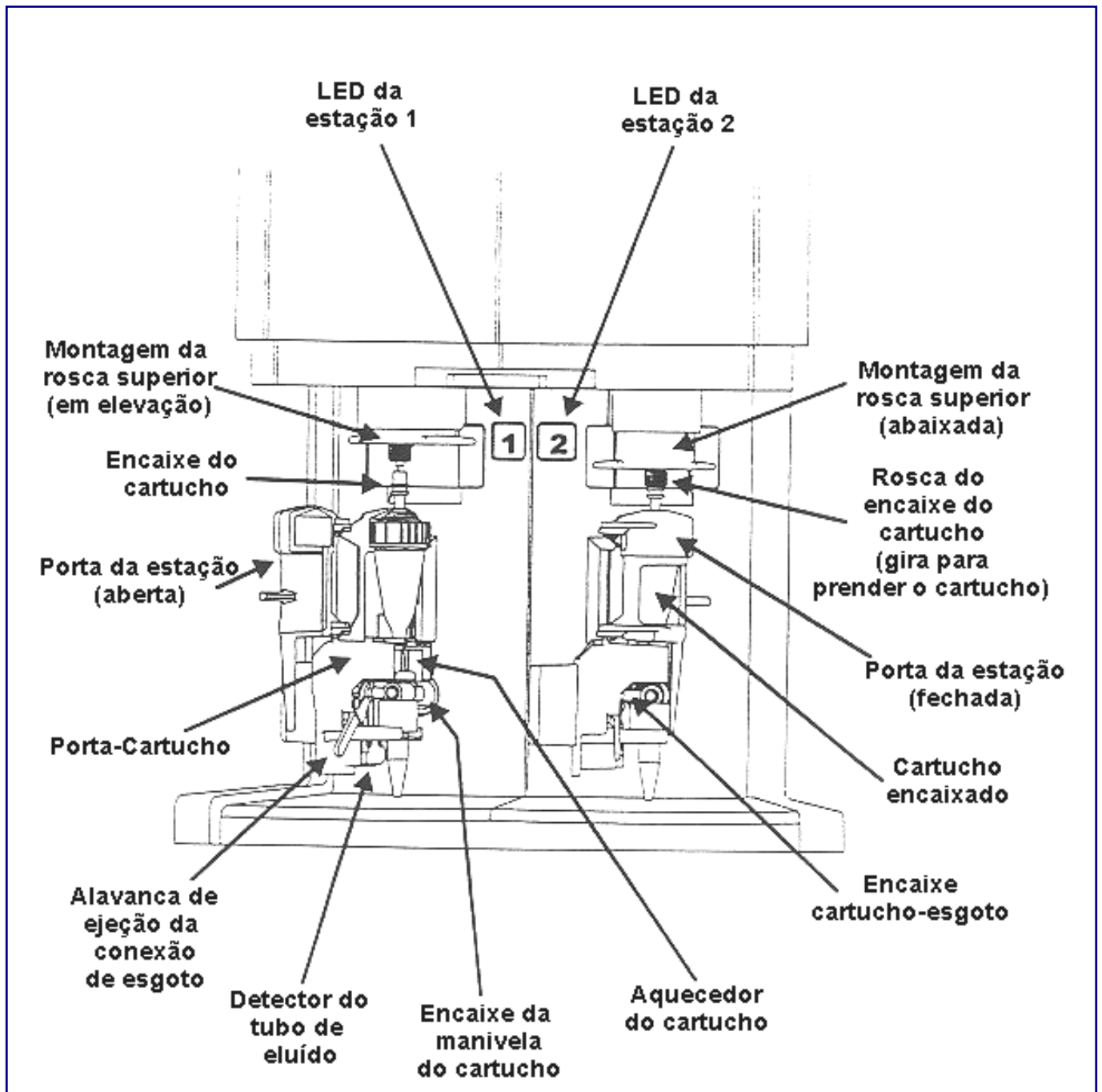
Desde sua introdução, os ensaios de amplificação de DNA/RNA têm provado ser uma ferramenta poderosa no uso diagnóstico e clínico. Para esta finalidade, um dos mais poderosos métodos de extração de ácidos nucleicos é a metodologia *BOOM*. O NucliSens Extractor é um equipamento desenhado para realizar o isolamento automatizado de ácidos nucleicos a partir de várias amostras biológicas, utilizando a metodologia *BOOM*.

O instrumento reduz significativamente o tempo necessário para a extração de ácidos nucleicos e reduz o risco de contaminação entre as amostras devido a seu sistema de extração totalmente fechado. O sistema é apropriado para o trabalho com um grande número de amostras na tecnologia NASBA.

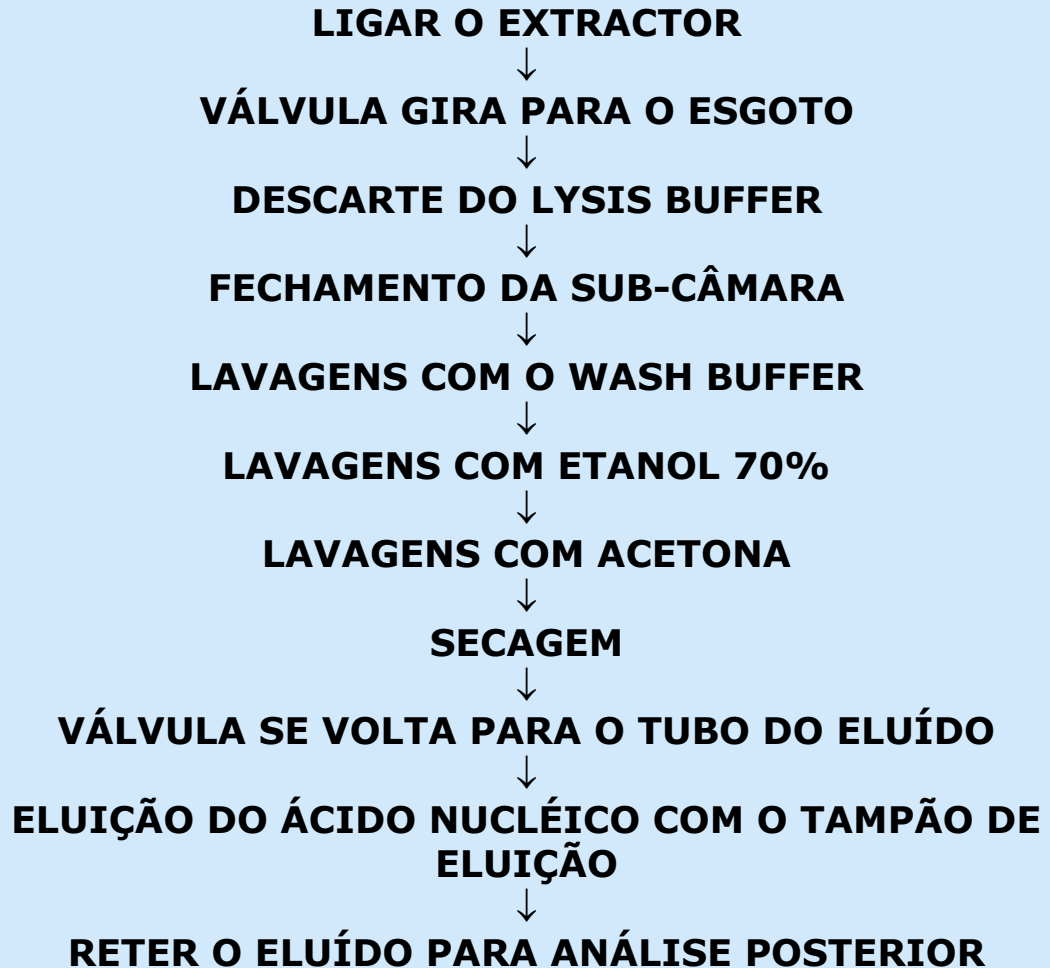
## CONFIGURAÇÃO DO SISTEMA



## CONFIGURAÇÃO DA UNIDADE PRINCIPAL



## **FLUXO DE TRABALHO DO EXTRACTOR**



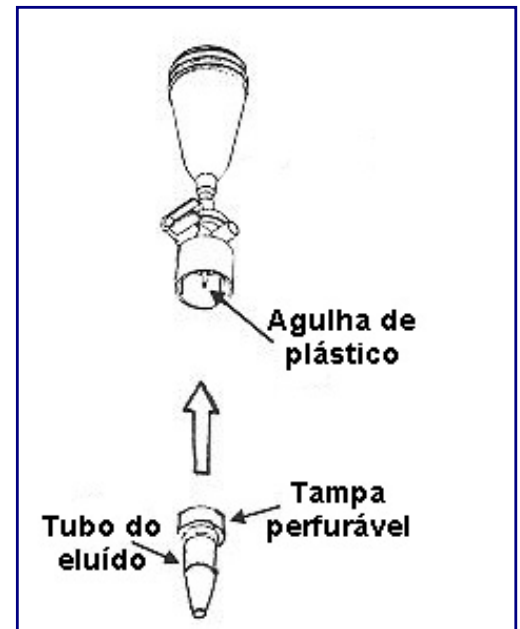
## PREPARAÇÃO DE AMOSTRA

TRABALHAR DE LUVA DURANTE TODAS AS ETAPAS DO PROCEDIMENTO

### 1) Preparação dos cartuchos :

**A.** ← Acoplar o tubo com tampa de silicone onde ficará o material eluído, segurando o cartucho com cuidado. Um som deve ser produzido quando a tampa do tubo for perfurada

**B.** ← Inserir o suplemento no local apropriado do cartucho. Força excessiva pode danificar o cartucho.



### 2) Liberação do Ácido Nucléico :

- ← Centrifugar o Tampão de lise a velocidade e tempo necessários para baixar todos os fluídos no tubo. Por exemplo, 2 minutos a 1500g.
- ← Centrifugar o tubo de amostra a velocidade e tempo necessários para baixar todos os fluídos no tubo.
- ← Abrir o tubo da amostra (com o auxílio de um papel absorvente ou gaze) e transferir para o tampão de lise a quantidade de amostra a ser testada.
- ← Adicionar os calibradores.
- ← Adicionar 50 $\mu$ L de sílica em cada tampão de lise. **Nota :** Centrifugar a sílica e depois vortexar vigorosamente a cada três pipetagens

### 3) Transferir o material para o cartucho :

- ← Vortexar o tampão de lise contendo amostra, sílica e calibrador.
- ← Tenha certeza que não existam cristais nos tampões de lise.
- Siga corretamente o esquema de preparação das amostras.
- O tampão de lise com a amostra devem estar a temperatura ambiente.



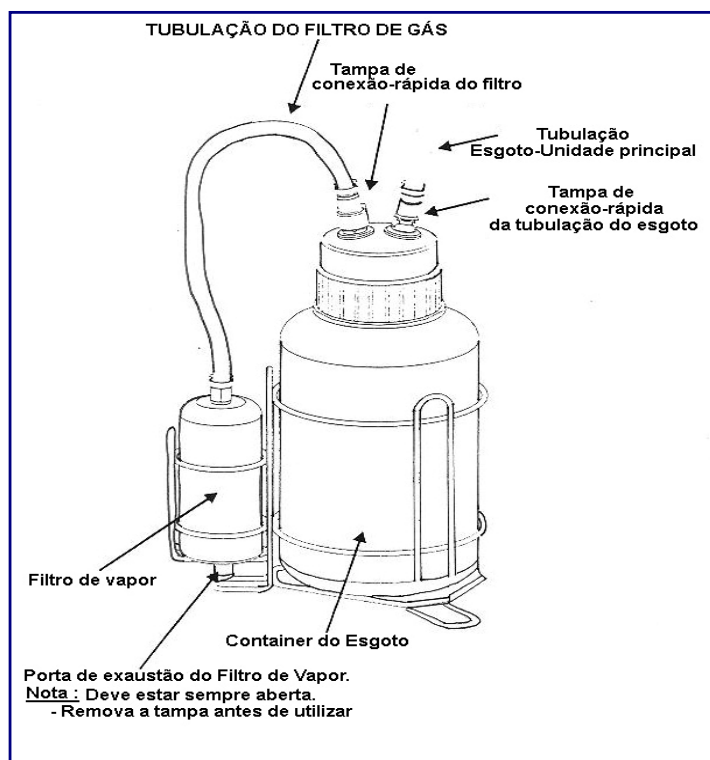
**Para fechar o cartucho, seguir o esquema abaixo:**



- A tampa está fechada adequadamente quando a seta na tampa do cartucho está entre as 2 marcas da câmara de amostra.
- Não tente abrir a tampa, no caso de a amostra passar da segunda marca. Isso pode ocasionar vazamentos. Prosseguir com o teste assim mesmo.

**PROCEDIMENTOS INICIAIS DIÁRIOS :**

1. ← LIGAR O EQUIPAMENTO - Ouve-se um BEEP sonoro (mais de um BEEP significa erro)
2. ← Checar o nível do esgoto. O esgoto deve ser esvaziado quando o galão de esgoto estiver aproximadamente com  $\frac{3}{4}$  do volume total. Lavar o galão com água.
3. ← Verificar se as mangueiras estão conectadas corretamente ao esgoto e ao filtro de vapor e se a porta de exaustão do filtro de vapor está aberta.



**OBS:** Trocar o filtro de vapor a cada 6 meses.

4. ← Verificar o cartucho de secagem de ar. Este cartucho é preenchido com sílica de coloração azul. Quando este cartucho estiver  $\frac{3}{4}$  rosa, ele deve ser substituído. **Nota :** Colocar sempre o cartucho com a parte rosa voltada para baixo.
5. ← Carregar os reagentes : Quando **frascos novos** de reagentes (com volume total) forem colocados em uso, pressionar a opção LOAD para atualizar o volume. **Nota :** Se NÃO forem colocados novos frascos de reagentes, NÃO pressionar LOAD. Só instale frascos cheios no Extractor. O Extractor não tem sensor de nível. Ele é capaz de calcular volumes já utilizados e volumes restantes.
6. ← Recolocar a garrafa de Wash Buffer no equipamento.
7. ← Fazer o PRIME, duas vezes, com o Wash Buffer e todos os outros reagentes. Aguarde o ciclo total de cada PRIME.
  - Na tela TOP pressione a opção REAGENTS. Pressione então a opção PRIME do reagente desejado (Fazer o PRIME de todos os reagentes quando inicializar o equipamento, UM DE CADA VEZ). Para retornar à tela TOP, (inicial) apertar a opção [TOP].

REAGENTE	QUANTIDADE
Cartuchos	1 por amostra
Tubo de lysis Buffer	1 por amostra
Silica	50 $\mu$ L de suspensão por amostra
Wash Buffer – Tampão de Lavagem	1 frasco (450mL) para 5 corridas de 10 amostras cada.
Tampão de Eluição	1 frasco para 1 corrida de 10 amostras
Acetona	1000mL para 20 corridas de 10 amostras
Etanol 70%	1000mL para 12 corridas de 10 amostras
Cleaner (água própria para laboratório, grau 1 ou melhor)	500mL por dia de operação

8. ← Selecione a função PRESS TEST do menu de MAINTENANCE (manutenção) para tirar qualquer líquido dos tubos de limpeza das 10 estações do equipamento. Após realizar o PRESS TEST, pressionar a opção [BAK].
9. ← Remover os tubos de limpeza das estações que serão utilizadas.
  - ← Levante as portas de segurança
  - ← Abra a porta das estações, segure o tubo de limpeza, e desconecte a Rosca superior do tubo de limpeza.
  - ← Com o auxílio das alavancas de ejeção, (mova-as para a esquerda), desengate o tubo de limpeza da conexão de esgoto.

10. Colocar os cartuchos contendo as amostras, sílica e calibradores (devidamente fechado) no extractor.

- ← Sempre colocar um cartucho na posição 1
- Quando menos de 10 amostras forem ser extraídas num ensaio, distribuir os cartuchos de maneira aproximadamente balanceada nas estações de trabalho do extractor. Estações utilizadas :

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

- ← Insira a manivela da válvula do cartucho na fenda própria e deslize o cartucho até que a conexão com o equipamento fique segura. Deslize o cartucho fazendo pressão tanto na parte inferior como na superior do cartucho.
- ← Feche a porta da estação.
- ← Encaixe gentilmente a *rosca* superior da estação ao cartucho. **NÃO FORCE A ROSCA.**
- ← Após carregar todos os cartuchos, feche as portas de segurança do equipamento.

11. Iniciar o Extractor

- ← Pressione a opção [RUN] no menu inicial.
- ← No menu que aparece selecione a opção aproximada do volume de extração; no caso, maior que 11mL.
- Se cartucho estiver colocado de maneira apropriada o LED da estação ficará verde. Para isso, 1- A *rosca* da estação tem de estar conectada ao cartucho; 2- O eppendorff para eluição tem que estar em posição; 3- A porta da estação tem de estar fechada.
- ← Pressione a opção [START] para começar a extração

12. DESCARREGANDO O EQUIPAMENTO

Quando acabar a corrida o alerta [UNLOAD]

- ← Selecione a opção [UNLD], a tela de UNLOAD vai aparecer mostrando o estatus das 10 estações de trabalho.
  - ← Levante as portas de segurança
  - ← Abra a porta das estações e desconecte a *Rosca* superior do cartucho
  - ← Com o auxílio das alavancas de ejeção, (mova-as para a esquerda), desengate o cartucho da conexão de esgoto.
  - ← Cuidadosamente remova os cartuchos do equipamento.
  - ← Remova o tubo contendo o eluído do cartucho.
  - ← Descarte os cartuchos em um container de biossegurança dentro de 15 minutos.
  - ← Após remover todos os cartuchos, pressione a tecla [OK].



B I O M É R I E U X



B I O M É R I E U X

## NUCLISENS READER

### Nucleic acid diagnostics

#### 5.2 Descrição de Operação do Equipamento NucliSens® Reader:

O leitor **NUCLISENS READER**, deve ser ligado no mínimo duas horas antes da leitura das amostras.



#### **Laboratórios integrantes da Rede Nacional de Carga Viral do Ministério da Saúde:**

Como seu computador possui o sistema SISCEL, ao ligar o computador uma tela com uma lista de opções aparecerá. Escolha a opção 8 (oito) para que o sistema NucliSens seja carregado no seu computador.



#### **Todos os usuários:**

Seu computador pode estar configurado para entrada direta no sistema NASBA ou no sistema NUCLISENS. Visualmente os dois sistemas são muito parecidos, assim confira sempre no canto superior esquerdo da tela se o seu computador se encontra no sistema desejado. Para mudar de um sistema para outro, quando a seguinte mensagem aparecer na tela:

<p>Prime the instrument ?</p> <p><b>Prime</b> <b>Skip</b> ?</p>	Escolha	<b>Skip</b>
---	---------	-------------

Em seguida aparecerá a tela de LOGIN :

User Name :	<input type="text"/>
Password :	<input type="password"/>
<b>LOGIN</b>	

Para logar, clique no campo "User name" (nome do usuário) e escolha um nome da lista de usuários e pressione "Enter". Digite o "Password" (senha) associado ao usuário. Agora clique no botão **LOGIN**.

Em seguida, no menu **ROTINE**,

<b>Routine</b>	<b>Setup</b>	<b>Instrument Service</b>	<b>Help</b>
----------------	--------------	---------------------------	-------------

clique na opção "**EXIT TO DOS**".

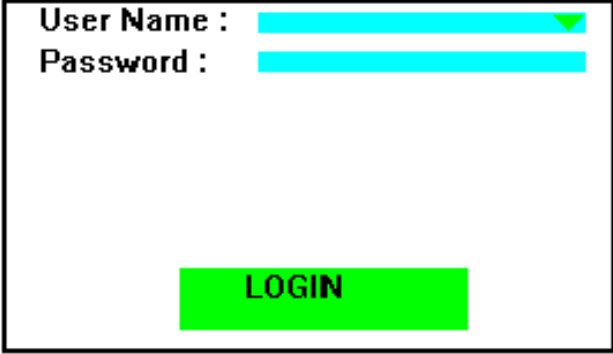
Na tela que aparece, digite o nome do programa que você deseja trabalhar, por exemplo, **nuclisens**.

**OS PROCEDIMENTOS RESUMIDOS ABAIXO, ESTÃO DESCRITOS DE FORMA COMPLETA NO MANUAL DO USUÁRIO, SEÇÃO DE "PROCEDIMENTOS BÁSICOS DE OPERAÇÃO".**

Quando o computador for ligado, a seguinte mensagem aparecerá:

<p>Prime the instrument ?</p> <p><b>Prime</b> <b>Skip</b> ?</p>	Escolha	<b>Prime</b>
---	---------	--------------

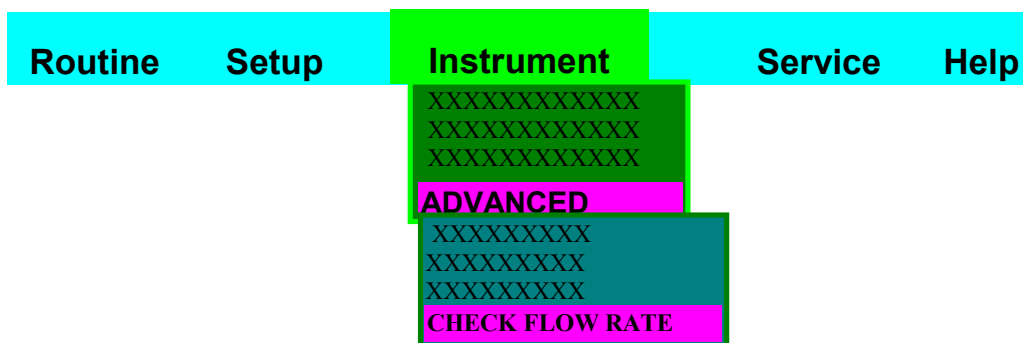
Em seguida aparecerá a tela de LOGIN :



The screenshot shows a login interface with two input fields: "User Name" and "Password". Below these fields is a prominent "LOGIN" button.

Para logar, clique no campo "User name" (nome do usuário) e escolha um nome da lista de usuários e pressione "Enter". Digite o "Password" (senha) associado ao usuário. Agora clique no botão **LOGIN**.

A tela principal do sistema será carregada e mostrará a última rotina carregada no sistema. Antes de começar a leitura, você deve verificar se o equipamento esta pipetando corretamente. Para isso no menu principal (abaixo representado), escolha a opção **INSTRUMENT** e no menu que se abre, escolha a opção **ADVANCED**.



No menu **ADVANCED** selecione a opção **CHECK FLOW RATE**, e realize o procedimento descrito. Faça o check flow rate sempre que ligar o equipamento antes de uma nova rotina.

Agora já podemos entrar com os nomes da nova rotina. Para isto clique na opção **ROUTINE** do menu:



e no menu de opções que surgir clique na opção **NEW RUN**. A seguinte tela aparecerá :

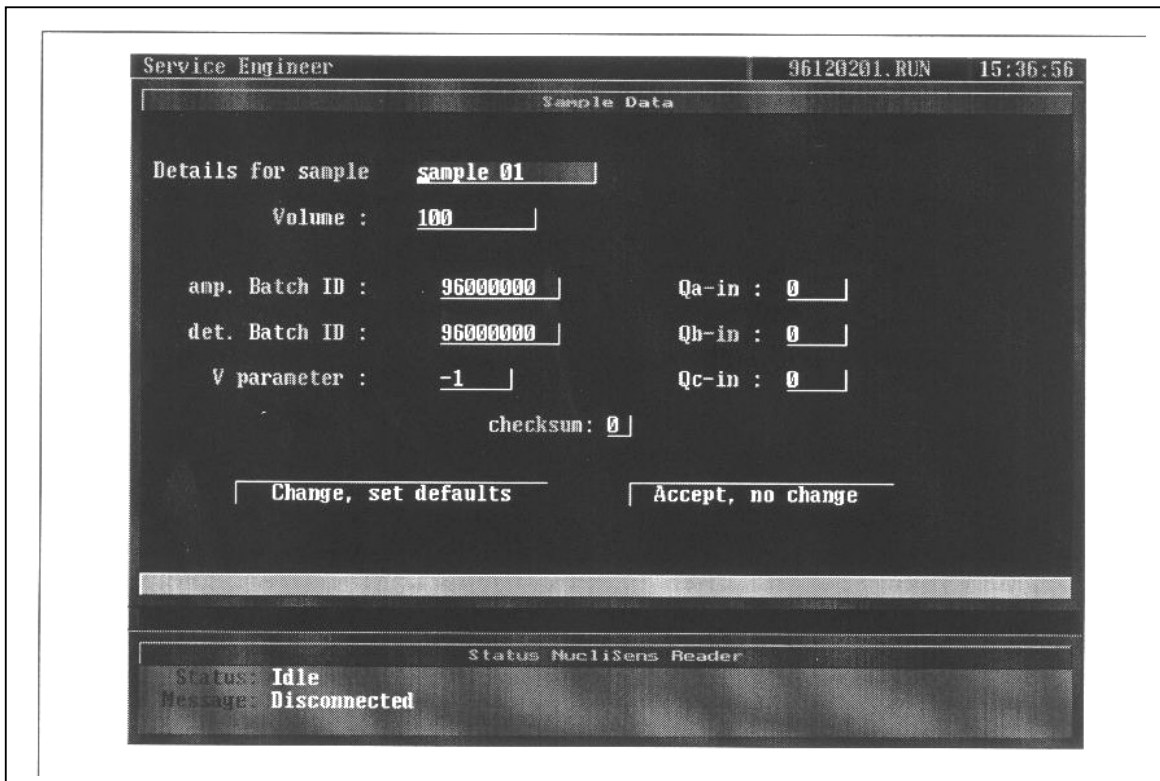
<p><b>Flush current Worklist ?</b></p> <p><b>no</b>      <b>yes</b></p>	<p>Selecione a opção</p>	<p><b>yes</b></p>
---	--------------------------	-------------------

A tela que dá o nome aos ensaios aparecerá. O nome do ensaio é dado de acordo com a data e o número de ensaios rodados previamente naquele dia: **98010701.run** (ou seja ano/mês/dia/número do ensaio naquela data.**run**). Clique em **OK**.

A tela com a lista de trabalho (Worklist) aparecerá. O começo da rotina já aparecerá na tela, com o tubo referente à solução de referência (**RS**) como tubo 1. Abaixo da tabela principal aparecerá a seguinte tabela:

Selected Assay:	<b>HIV-1 QT</b>		
Sample ID: :		Vol: :	
<b>Delete from List</b>		<b>Print Worklist</b>	<b>Cancel</b>
<b>Add to List</b>		<b>Close</b>	

Clique sobre o select assay e selecione a opção **HIV-1 QT**. No espaço do **SAMPLE ID** digite a identificação da amostra. No espaço **VOL** digite o volume exato de amostra utilizado para o teste daquele paciente (= volume de plasma em  $\mu$ l pipetado no Tampão de Lise). Quando tudo estiver preenchido corretamente, clique o **ADD TO LIST** (adicionar à lista). A tela de Informação da Amostra ("Sample Data") aparecerá :



No espaço **Details for Sample** vai estar o número de identificação da amostra. No **VOLUME**, vai estar a quantidade de volume de amostra testada.

Ao lado do campo **AMP. BATCH ID** coloque o número de lote de amplificação utilizado para aquela corrida. Ao lado do campo **DET. BATCH ID** coloque o número de lote do kit de detecção utilizado. Os dados a serem inseridos nos campos de **V PARAMETER; QA-IN; QB-IN; QC-IN** e **CHECKSUM** se encontram na etiqueta afixada na caixa do kit de detecção. Entre com os dados corretamente. Os dados variam lote a lote.

Para aceitar os dados introduzidos, selecione a opção **CHANGE, SET DEFAULT**. Na hora de cadastrar a segunda rotina de um mesmo kit, não há a necessidade de entrar com os valores de **AMP. BATCH ID; DET. BATCH ID; V PARAMETER; QA-IN; QB-IN; QC-IN** apenas o **CHECKSUM** deve ser colocado novamente. Neste caso escolha a opção **ACCEPT, NO CHANGE**.

**ATENÇÃO :** Se você tiver que alterar algum dado, como por exemplo a identificação da amostra ou o volume utilizado, preencha novamente o campo **CHECKSUM** e escolha a opção **CHANGE, SET DEFAULT**.



**NOTA:** Se o **CHECKSUM** não for preenchido corretamente o computador não prossegue. No caso de o **CHECKSUM** estar correto e o computador não aceitar os dados, verifique todos os dados inseridos novamente. Pode ter ocorrido algum erro de digitação.

Para as amostras seguintes, não é necessário preencher os dados de **AMP. BATCH ID; DET. BATCH ID; V PARAMETER; QA-IN; QB-IN; QC-IN** e **CHECKSUM** novamente. Para estas amostras basta inserir os dados de **SAMPLE ID** e **VOL.** (No espaço do **SAMPLE ID** digite a identificação da amostra. No espaço **VOL** digite o volume exato de amostra utilizado para o teste daquele paciente. Quando tudo estiver preenchido corretamente, clique o **ADD TO LIST**). Repita o procedimento para cada uma das amostras e ao terminar clique o **"CLOSE"**. (maiores informações encontram-se no manual do usuário).

A tela com as **INFORMAÇÕES SOBRE AS AMOSTRAS** (*"Sample Details"*) deve surgir no seu computador !!!

Nesta tela existe uma tabela com os dados de todas as amostras que compõem aquela rotina. Caso exista a necessidade de editar algum dado em alguma das amostras, proceda da seguinte maneira:

- Clique sobre a amostra a ser editada.
- Faça as modificações necessárias, preencha novamente o **CHECKSUM** e escolha a opção **CHANGE, SET DEFAULT**.

Para sair da tela **INFORMAÇÕES SOBRE AS AMOSTRAS** selecione a opção **OK**.

A tela com a lista de trabalho aparecerá.

### **Carregue o carrossel :**

Para soltar o carrossel, retire a tampa, pressione a alavanca de ejeção no lado esquerdo inferior do painel frontal da leitora, mantenha a alavanca pressionada e puxe o carrossel. Coloque as amostras no carrossel da maneira indicada na tela do computador e recoloca o carrossel no aparelho. O carrossel encaixa debaixo do experimentador de amostra. Coloque o carrossel embaixo do experimentador e empurre para trás até travar na

posição correta. Um click é ouvido quando o carrousel encaixa na posição correta. Recoloque a tampa, e no menu selecione a opção **Routine**

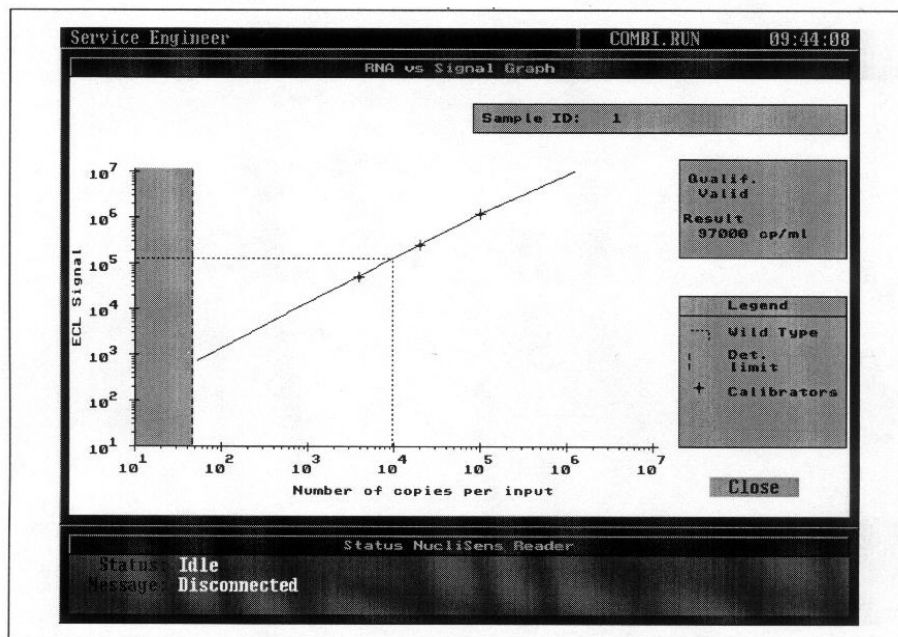


Clique na opção **RUN WORKLIST** e o aparelho começará a realizar a leitura das amostras. Para ver o resultado de cada amostra, clique a opção **ROUTINE** novamente, mas desta vez escolha a opção **SAMPLE RESULT**.

Para selecionar uma amostra clique no espaço ao lado do campo **SELECTED SAMPLE** e clique sobre a amostra desejada.

Para imprimir o resultado de uma amostra, selecione a amostra desejada e clique na opção **PRINT**.

Para ver o gráfico da amostra selecionada clique sobre a opção **VIEW GRAPH** no canto superior direito da tela. A seguinte tela aparecerá :



Para sair do gráfico, clique em **CLOSE** localizado no canto direito inferior do gráfico. Para ver todos os resultados juntos, mas sem o gráfico, escolha a

opção **ASSAY RESULT.**

C:\NUCLISEN\RUNS\99032402\_RUN  
 Created : 24 Mar 1999 - 10:55  
 Assay : Hiv-1 Qt

Sample ID	Qualif.	Result	Tube	Dct.	Log(Q-in)	Signal
721 1000µl	Valid	< LDL	03	WT		5
			04	Qa	5.016	935036
			05	Qb	4.290	225477
			06	Qc	3.615	43735
722 1000µl	Valid	4000 cp/ml	07	WT		39021
			08	Qa	5.016	910824
			09	Qb	4.290	210269
			10	Qc	3.615	37841
723 1000µl	Valid	2000 cp/ml	11	WT		17502
			12	Qa	5.016	847700
			13	Qb	4.290	156576
			14	Qc	3.615	37647
724 1000µl	Valid	8400 cp/ml	15	WT		68016
			16	Qa	5.016	875580
			17	Qb	4.290	193348
			18	Qc	3.615	23814
725 1000µl	Valid	43000 cp/ml	19	WT		32272 3
			20	Qa	5.016	645815
			21	Qb	4.290	147432
			22	Qc	3.615	37544
726 1000µl	Valid	43 cp/ml	23	WT		409
			24	Qa	5.016	864070
			25	Qb	4.290	182546
			26	Qc	3.615	39880
727 1000µl	Valid	< LDL	27	WT		1
			28	Qa	5.016	900271
			29	Qb	4.290	182008
			30	Qc	3.615	35868
728 1000µl	Valid	280 cp/ml	31	WT		3104
			32	Qa	5.016	974565
			33	Qb	4.290	191590
			34	Qc	3.615	52159
729 1000µl	Valid	< LDL	35	WT		327
			36	Qa	5.016	899942
			37	Qb	4.290	194014
			38	Qc	3.615	53460
730 1000µl	Valid	2000 cp/ml	39	WT		19660
			40	Qa	5.016	982991
			41	Qb	4.290	227818
			42	Qc	3.615	32017

O resultado de uma amostra só sai quando todos os quatro tubos da amostra já tiverem sido lidos. O aparelho só imprime os resultados quando acabar de ler toda a rotina. Para imprimir resultados individuais com gráfico escolha a opção **PRINT** da tela **SAMPLE RESULT.** Para imprimir todos os resultados numa folha só, sem gráfico escolha a opção **PRINT** da tela **ASSAY RESULT.**

### 5.3 Outros Equipamentos Utilizados na Tecnologia NASBA

#### MANUAL DE OPERAÇÕES BÁSICAS DO TERMOBLOCO SKS DUPLO DIGITAL-BIOMEDICAL

a) Para Ligar o Equipamento:  
Colocar o interruptor localizado na parte traseira do equipamento na posição Liga (I). A posição O configura aparelho desligado.

b) Para Selecionar a Temperatura Desejada:  
Mantenha o HEATER em posição OFF (luz verde acesa) e pressione a seta ▲ para aumentar os valores da temperatura ou pressione a seta ▼ para diminuir a temperatura, até o ajuste da temperatura desejada.

c) Para Aquecer o Equipamento:  
Pressionar o botão HEATER de forma que a luz verde acenda em ON. A luz verde acesa em OFF, configura aquecimento desligado.

d) Para visualizar uma temperatura selecionada:  
Pressione o botão Sel .

#### Considerações:

Por se tratar de banho seco, recomendamos não adicionar água nos blocos. A Limpeza do equipamento pode ser realizada com uma gaze umedecida com água de laboratório pura e imediatamente seca (para evitar cristalizações sobre o equipamento).  
Voltagem 110V/220V.

#### MANUAL DE OPERAÇÕES DO TERMOBLOCO TECHNE DRI-BLOCK DB-2D

a) Para Ligar o Equipamento:  
Colocar o interruptor localizado na parte traseira do equipamento na posição Liga (I).  
Ao ligar o equipamento a temperatura subirá instantaneamente até atingir a temperatura selecionada.  
A posição O configura aparelho desligado.

b) Para Selecionar a Temperatura Desejada:  
Pressionar o botão SET e ao mesmo tempo pressione a seta ▲ para aumentar os valores de temperatura ou pressione a seta ▼ para diminuir a temperatura, até o ajuste da temperatura desejada.

c) Para visualizar uma temperatura selecionada:  
Pressione o botão Set .

Considerações:

Por se tratar de banho seco, recomendamos não adicionar água nos blocos. A Limpeza do equipamento pode ser realizada com uma gaze umedecida com água de laboratório pura e imediatamente seca (para evitar cristalizações sobre o equipamento).  
Voltagem 110V/220V.

MANUAL DE OPERÇÕES BÁSICAS DO BANHO-MARIA GFL®

a) Para Ligar o Equipamento:

Colocar o interruptor localizado na parte frontal do equipamento na posição Liga (I).

Ao ligar o equipamento o aquecimento da água irá iniciar até a temperatura selecionada. A posição O configura aparelho desligado.

b) Para Selecionar a Temperatura Desejada:

Pressione o botão °C e ao mesmo tempo pressione + para aumentar os valores de temperatura ou pressione - para diminuir a temperatura, até o ajuste da temperatura desejada.

c) Para visualizar uma temperatura selecionada:

Pressione o botão °C.

Considerações:

Recomendamos adicionar água purificada, Destilada ou Bidestilada. Para limpeza ideal do equipamento deve-se efetuar a troca de água semanalmente.  
Voltagem 110V/220V.

MANUAL DE OPERÇÕES BÁSICAS DA MICROCENTRÍFUGA EPPENDORF®

a) Para ligar o equipamento coloque o interruptor na posição Liga (I).

b) Ajustar a velocidade desejada em rotações por minuto (rpm), girando o botão *rpm*.

c) Ajustar o tempo em minutos girando o botão *min*.

OBSERVAÇÃO: não esqueça de fechar o rotor, encaixando e girando a tampa. Não esqueça de realizar *sempre* a checagem do balanceamento dos microtubos no rotor.

d) Ao terminar o tempo estipulado, a centrifugação cessa automaticamente.

## 6. Manutenção, Limpeza e Desligamento do Sistema NASBA



### EXTRACTOR

#### Nucleic acid diagnostics

## PROCEDIMENTOS DE MANUTENÇÃO DIÁRIA APÓS O TÉRMINO DA ROTINA

### **LIMPEZA EXTERNA DIÁRIA**

1. ← Remover todos os cartuchos.
2. ← Limpe a parte externa do instrumento com um pano e etanol 70%.
3. ← Limpe as roscas superiores e a conexão com o esgoto (em cada estação da unidade principal) usando um cotonete ou uma gaze.
4. ← Inspeccione visualmente as seringas quanto a vazamentos. (Qualquer vazamento entrar em contato com a Assistência Técnica)
5. ← Verifique o nível do esgoto. (Mais de  $\frac{3}{4}$  cheio deve ser esvaziado e a frasco lavado com água.
6. ← Inspeccione toda a tubulação quanto a sinal de vazamentos nos *PLUGS*.
7. ← Inspeccione o *PLUG* do **Wash Buffer** quanto a cristalização. Na presença de cristais lave vigorosamente a tampa e o *PLUG* com etanol 70%.

ANTES DE RODAR OS PROCEDIMENTOS DE SHUT-DOWN, INSTALE OS TUBOS DE LIMPEZA EM TODAS AS DEZ ESTAÇÕES.

- ← Em cada estação, coloque uma extremidade do tubo de limpeza na rosca superior e gire-a gentilmente. Conecte a outra metade na conexão da estação com o esgoto.

## SHUT-DOWN DIÁRIO (1)

1. ← Instale os tubos de limpeza.
2. ← No lugar do **Wash Buffer** instale a garrafa "**Cleaner**" contendo água de laboratório tipo 1 que deve ser exclusiva do procedimento de *Shut-Down*.
3. ← Na posição CLEANER da unidade principal do Extractor, instale uma outra garrafa de "**Cleaner**" contendo etanol 70%
4. ← No menu TOP, selecione a opção [Shutdown 1].
5. ← Pressione a opção [OK] se necessário.
6. ← Pressione a opção [START] para começar o ciclo de limpeza.
7. ← Depois de completar o ciclo de limpeza, desligue o equipamento, pressionando o interruptor externo.

**NOTA:** Este procedimento deixa fluídos de limpeza no instrumento e nos tubos de limpeza, que conservará a tubulação livre de cristalização.

## SHUT-DOWN PARA O FIM DE SEMANA (2)

1. ← Faça a limpeza externa diária.
2. ← Instale os tubos de limpeza.
3. ← No lugar do **Wash Buffer** instale a garrafa "**Cleaner**" contendo etanol 70%.
8. ← No menu TOP, selecione a opção [Shutdown 2].
9. ← Pressione a opção [OK] se necessário.
10. ← Pressione a opção [START] para começar o ciclo de limpeza.
11. ← Depois de completar o ciclo de limpeza, desligue o equipamento, pressionando o interruptor externo.

**NOTA:** Este procedimento deixa fluído de limpeza no instrumento e nos tubos de limpeza, que conservará a tubulação livre de cristalização.

## PROCEDIMENTO CLEAN

O Procedimento CLEAN deve ser feito como rotina para prevenir entupimentos e também verificar se há vazamentos em alguma estação - o aparecimento de muitas bolhas de ar sugere vazamento na estação (neste caso contacte a assistência técnica da empresa).

Para realizar o procedimento CLEAN o usuário deve seguir os seguintes passos:

1. ← Instale os tubos de limpeza.
2. ← No lugar do **Wash Buffer** instale a garrafa "**Cleaner**" contendo etanol 70%.
3. ← No menu TOP, selecione a opção [CLEAN].
12. ← Pressione a opção [OK] se necessário.

Observação: verifique o nível de etanol 70% na garrafa (a garrafa deve estar no mínimo pela metade do seu volume total).



## NUCLISENS READER

### Nucleic acid diagnostics

**DESLIGANDO O EQUIPAMENTO:** O aparelho deve ser desligado após a última leitura do dia e ligado novamente 2 horas antes da próxima leitura. No menu **INSTRUMENT**

**Routine Setup Instrument Service Help**

escolha a opção **SHUTDOWN**. O computador solicitará que as tubulações da solução **CLEANER SOLUTION** e da solução **ASSAY BUFFER** sejam colocadas em água destilada e/ou deionizada. Quando estiverem prontas, pressione qualquer tecla para dar início à operação.

Quando o computador acabar de circular água por sua tubulação, emitirá um som e pedirá que os tubos sejam colocados no ar. Para dar início à operação, com os tubos já no ar, aperte qualquer tecla. Quando o computador acabar de circular ar nos tubos, aparecerá a seguinte mensagem na tela :

*APERTE A TECLA ESC, SAIA DO SISTEMA NUCLISENS (\*),*

*CONFIRME SUA SAÍDA, **DESLIGUE O LEITOR**, E DEPOIS O COMPUTADOR.*

(\*) Para sair do sistema NucliSens selecione o menu **ROUTINE**, clique em Quit e clique na opção "**EXIT TO DOS**".

**FAÇA SEMPRE O SHUTDOWN ANTES DE  
DESLIGAR O EQUIPAMENTO !!!!**

## **Procedimentos Necessários para Manutenção do READER NucliSens**

O seu aparelho foi devidamente calibrado por um de nossos técnicos, mesmo assim ele precisa de cuidados especiais para manter esta calibração:

PROCEDIMENTOS DE MANUTENÇÃO DO READER NUCLISENS :

1. O equipamento deve ser desligado sempre após a sua utilização, nunca esquecendo de se realizar o **Shut down**.
2. Ao se ligar o equipamento para uma nova detecção, deve-se realizar o procedimento de **prime** e **check flow rate**.
3. Uma vez por semana, o laboratório deve proceder com o teste de **Backflush**.

**Shut down** (diário, sempre após ler a rotina)

1. Retirar as tubulações do Assay Buffer e do Cleaning Solution e colocá-las em água destilada, e iniciar o **Shut down** (dentro do menu **instrument**).
2. Após o leitor circular água pela tubulação, o sistema circula ar para secar a tubulação. Para isto, deve se retirar as tubulações da água e deixar no ar. Nunca esqueça de circular ar na tubulação. Quando acabar o shutdown, recoloque a tubulação nos tubos correspondentes.

**Check flow rate** (diário, sempre antes de ler a rotina)

1. Retire a mangueira do reservatório de esgoto e coloque na proveta fornecida junto com o equipamento.
2. No menu **Instrument**, escolha a opção **Advanced**, e de dentro desse menu escolha **check flow rate**, e clique **Pump 8.5 mL**. O equipamento desprezará um volume na proveta.
3. Descarte o volume e volte a mangueira na proveta. Pressione novamente **Pump 8.5 mL**.
4. Meça o volume e caso esse não seja de  $8.5 \pm 0.1$  mL, coloque o volume medido no quadro **Flow Volume (mL)**, pressione **Calculate new index** e repita o passo 3. Se o valor obtido for menor do que 6, feche a tela e chame a assistência técnica.
5. Caso o volume agora esteja em 8.5 mL termine o procedimento e realize o procedimento seguinte (**backflush**).

**Backflush** (**semanal** sempre após a leitura do último teste, não esquecendo de realizar o check flow rate antes)

1. Proceda com esse teste apenas se o teste anterior passar, caso contrário chame a assistência técnica.
2. Retire a mangueira do reservatório do esgoto, limpe-a e coloque em um Becker com água bidestilada.
3. Retire o carrossel
4. Coloque um frasco receptor abaixo da agulha de sucção da amostra (parte frontal acima da primeira posição do carrossel). Consulte o Manual.
5. No menu **Instrument**, escolha a opção **Advanced** e depois **Backflush**. O equipamento irá aspirar reversamente a água, começando pelo esgoto e descartando na agulha frontal. Repetir o processo três vezes e encerrar o teste.

Quando terminar esse teste, proceda novamente o **check flow rate** e corrija caso necessário.



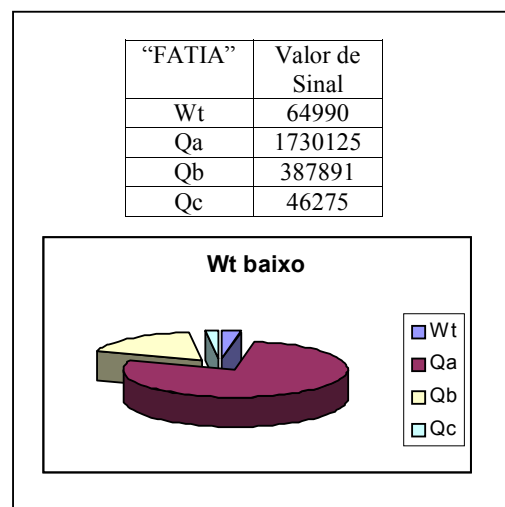
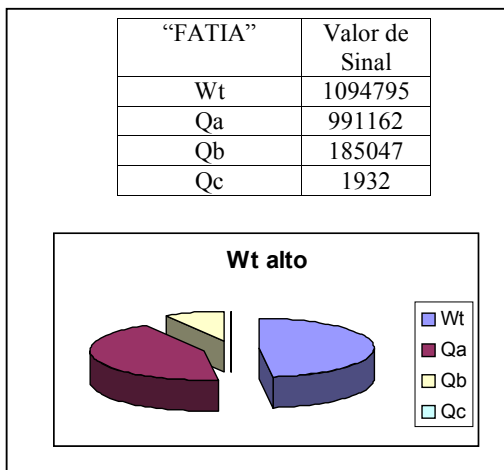
## 7. Procedimentos Básicos de Análise e Interpretação de Resultados

### Interpretação dos Resultados do NucliSens HIV-I QT

Como todos nós sabemos, 3 calibradores em concentrações conhecidas são adicionados à cada tubo de reação.

Na folha de resultados os sinais de eletroquimioluminescência referentes à amostra (Wt) e aos calibradores (Qa, Qb e Qc) são representados na coluna "SIGNAL". Para sabermos se a reação atingiu uma eficiência mínima satisfatória devemos somar todos os valores da coluna "SIGNAL" de uma determinada amostra. O valor da soma corresponde ao valor de *ECL TOTAL* para aquela amostra e pode ser comparado com uma "pizza inteira". Esta pizza pode ser dividida em 4 fatias de tamanhos diferentes, onde cada fatia corresponde ao sinal de ECL da amostra (Wt) e de cada um dos calibradores (Qa, Qb e Qc) respectivamente. Como o tamanho da "fatia" Wt vai variar conforme a carga viral do paciente, as "fatias" referentes aos calibradores também vão variar. Quanto mais alta for a carga viral do paciente, menor vai ser o sinal de ECL dos calibradores. Para validar o resultado de amostras com carga viral alta, basta calcular o *ECL TOTAL* daquela amostra e de uma outra amostra qualquer da mesma rotina (que tenha o seu resultado válido) e ver se os valores são similares.

#### EXEMPLO:

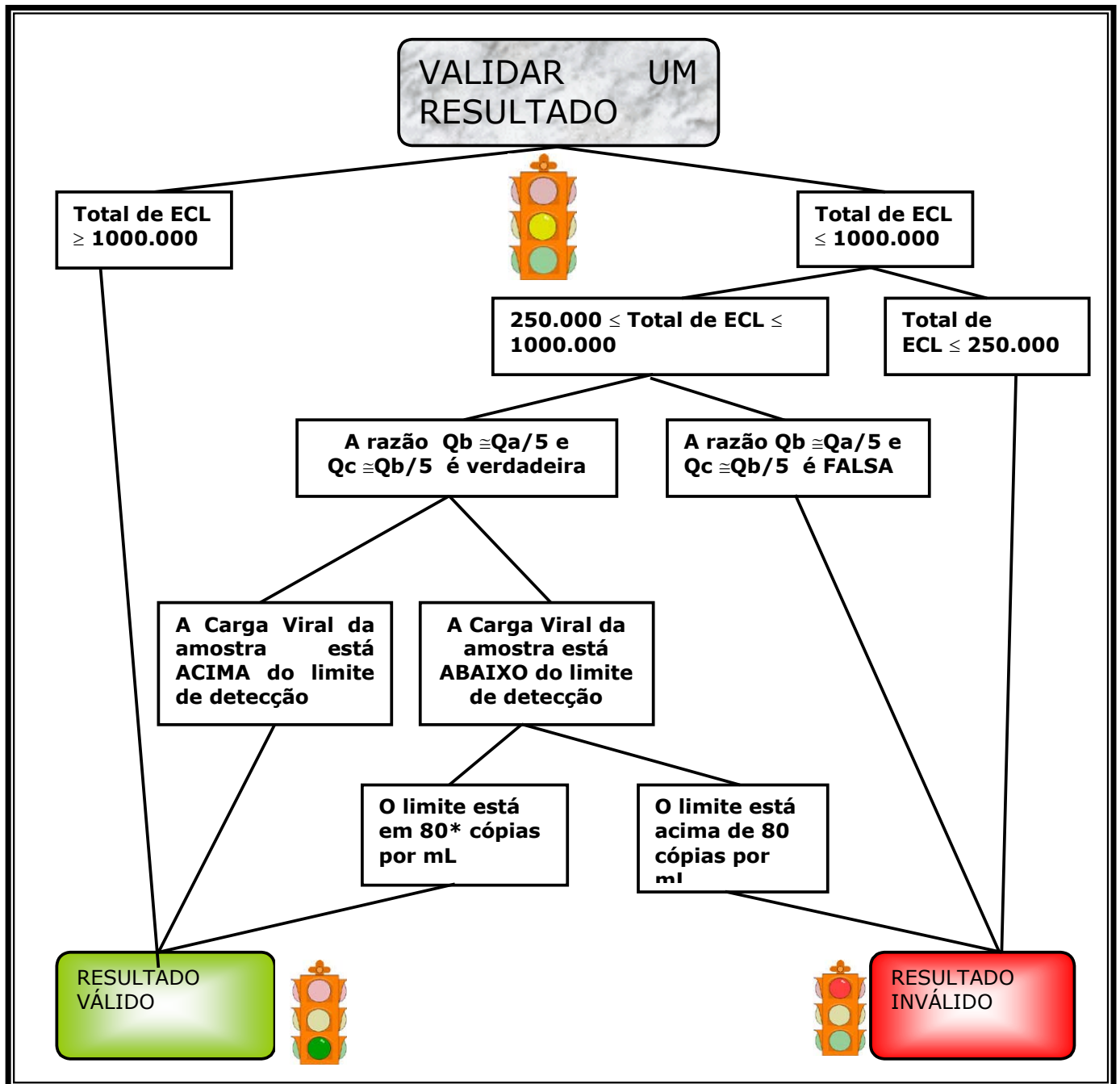


O valor de *ECL TOTAL* deve ser maior ou igual a 1.000.000 e deve ser bem próximo entre as amostras de uma mesma corrida. Quando o valor de *ECL TOTAL* está maior ou igual a 1.000.000 e o limite inferior de detecção está em 80\*, o resultado está válido.

No caso do valor de *ECL TOTAL* estar entre 250.000 e 1.000.000, devemos verificar se a proporção entre os calibradores está sendo respeitada. Para sabermos se o valor de sinal dos calibradores está dentro da proporção correta entre eles, basta dividir o valor de sinal do QA por 5. O valor obtido deve estar bem próximo ao valor de sinal de Qb. O mesmo deve ser feito com o valor de Qb para saber se

**verificar o valor do Qc. Caso a proporção tenha sido respeitada, as amostras que estiverem acima do limite de detecção podem ser validadas. As amostras que estiverem abaixo do limite de detecção só podem ser validadas quando o limite de detecção estiver em 80\*. Porém, quando o valor de *ECL TOTAL* for menor do que 250.000 o resultado do teste não pode ser considerado.**

**Lembre-se sempre que ao reportar um resultado é necessário respeitar o limite de detecção inferior, mesmo que o computador tenha liberado um valor de carga viral menor que o limite de detecção inferior descrito na bula do teste.**



## 8. Problemas, Causas e Soluções na Realização dos Testes – Códigos de Erros do Equipamento *NucliSens Reader*

<b>CÓDIGO DE ERROS</b>	<b>CAUSAS</b>	<b>PROCEDIMENTOS</b>
4002 a 4007	Erro de software	Chame a assistência técnica
4008	Corrida abortada pelo usuário	Você interrompeu a corrida, inicie novamente a corrida
4010 e 4011	Erro de software	Chame a assistência técnica
4012 a 4026	Erro de comunicação	Verifique os cabos de ligação ou se os equipamentos estão ligados
4027 a 4036	Erro de software	Chame a assistência técnica
4038	Erro de comunicação/Falha de instrumento	Verifique os cabos de ligação ou se os equipamentos estão ligados
4039	Volume de fluxo 0, não pôde processar ajuste do FRI	Chame a assistência técnica
4040	Volume de fluxo não pôde ser processado	Chame a assistência técnica
4042 a 4051	Erro de software	Chame a assistência técnica
4052	Erro de argumento na linha de comando ao iniciar	Desligue e ligue o PC novamente
4053	Arquivo de configuração PASM foi alterado	Chame a assistência técnica
4054	Arquivo de dados foi modificado	Chame a assistência técnica
4058	Nome do arquivo inválido	Escolha o nome do arquivo correto
4063	Erro de comunicação	Verifique os cabos de ligação ou se os equipamentos estão ligados
4068 a 4070	Erro de software	Chame a assistência técnica
4071	Arquivo de recurso corrompido	Chame a assistência técnica
4072	Seqüência do programa está em execução	Espera para poder operar
4073	Nenhuma seqüência do programa está em execução	Instrumento não disponível
4074	Não pôde ler o arquivo seqüência	Tente novamente a operação
4075	Erro de software	Chame a assistência técnica
4076	Sem memória suficiente para executar o programa	Desligue e ligue o PC novamente
4077	O adaptador do mouse não foi encontrado	Desligue e ligue o PC novamente
4078 a 4080	Erro de software	Chame a assistência técnica



<b>CÓDIGO DE ERROS</b>	<b>CAUSAS</b>	<b>PROCEDIMENTOS</b>
4081	Revisão da calibração incompatível	Chame a assistência técnica
4083	Arquivo de dados com mais de 50 tubos	Entre uma rotina com no máximo 12 amostras
4085	Teste em corrida não pode executar pedido	Aguarde terminar a rotina
4089	Marca incompatível de instrumentos	Mantenha os instrumentos PC, impressora e lei tor instalados pelo fornecedor
4090	Arquivo de calibração inválida incapaz de lê-lo	Chame a assistência técnica
4091	Arquivo de calibração inacessível	Chame a assistência técnica
4092	Erro da memória do PC	Desligue e ligue novamente o PC
4093 a 4094	Erro de Software	Chame a assistência técnica
4121	Download não completado	Tente a operação novamente
4131	Fim da espera no comando waitfor	Tente a operação novamente
4132 a 4199	Inicialização incompleta do download	Tente a operação novamente
4200 a 4205	Erro de PATH	Escolha o nome de path correto
4206	Nome do Arquivo DOS inválido	Escolha o nome do arquivo correto
4207 a 4209	Drive não está pronto	Coloque o disquete no drive e tente novamente
4241	Path vazio	Escolha o nome de path correto
4242 a 4246	Erro de software	Chame a assistência técnica
4248	Incapaz de achar ou abrir arquivo	Foi escolhido um nome de arquivo inválido. Escolha um correto
4301 a 4334	Erro estatístico	Chame a assistência técnica
4701	Tempo esgotado da impressora	Impressora sem uso por um longo tempo. Tente novamente conectando e ligando a impressora
4702	Impressora desligada	Ligue a impressora antes do PC
4703	Impressora selecionada não encontrada	Chame a assistência técnica
4704	Impressora sem papel	Coloque papel na impressora
4705	Erro da impressora-desligou?	Ligue a impressora antes do PC
4706	Erro da impressora	Ligue a impressora antes do PC
4802 a 4812	falhou a operação de leitura do disco	Tente novamente a mesma operação
4814	Erro da forma de calibração	Chame a assistência técnica

<b>CÓDIGO DE ERROS</b>	<b>CAUSAS</b>	<b>PROCEDIMENTOS</b>
4815	Arquivo path está vazio	Chame a assistência técnica
4816 a 4818	Erro de software	Chame a assistência técnica
4902	Memória insuficiente para executar o programa	Desligue e ligue novamente o PC
5000	Erro de software	Chame a assistência técnica
5001	Sistema foi resetado	Repita o procedimento
5003 a 5007	Falhou a operação de leitura de arquivos	Tente novamente a mesma operação
5018 a 5129	Erro de instrumento	Chame a assistência técnica
5130 a 5132	Erro de carrossel	Verifique se o carrossel está bem encaixado
5133	Nenhum tubo encontrado	Coloque os tubos no carrossel
5135 a 5182	Falha no experimentador	Chame a assistência técnica
5183	Carrossel não detectado	Encaixe bem o carrossel
5184 a 5599	Falha de instrumento	Chame a assistência técnica
7000	Erro de software	Chame a assistência técnica
7001	Nenhum usuário disponível no banco de dados	Arquivo de usuário não existe ou foi apagado Chame a assistência técnica
7002	ID do usuário já existe	Tente outro ID
7003	Não pode entrar nome do usuário em branco	Digite um nome para o usuário
7004	Não existem níveis definidos	Chame a assistência técnica
7005	Nome de nível já existente	Chame a assistência técnica
7006	Você deve selecionar um nome de nível	Escolha um nível disponível
7008	Senha incorreta	Digite a senha corretamente
7009	Senha deve ser digitada duas vezes	Redigite sua senha
7010	Senha nova é igual a antiga	Escolha uma senha diferente da anterior
7011	A senha pode conter apenas letras e números	Obedeça a especificação de caracteres
7012	A senha tem menos de 3 caracteres	Obedeça a especificação de caracteres
7014	Nenhuma mudança foi feita	
7016	Você não entrou no sistema de usuário para logar-se	Selecione o ID de usuário para logar-se
7017	Nenhum usuário disponível no banco de dados	O Arquivo de usuário não existe ou foi apagado. Chame a assistência técnica
7018	Nenhum ensaio selecionado	Selecione um ensaio válido HIV quantitativo
7019	Ensaio indefinido no arquivo Import de importação	Defina um ensaio a ser importado
7020	Lista de trabalho está cheia	Capacidade máxima 12 amostras

<b>CÓDIGO DE ERROS</b>	<b>CAUSAS</b>	<b>PROCEDIMENTOS</b>
7021	Carrossel está cheio	Capacidade máxima 12 amostras
7022	Lista de trabalho está correndo	
7023	Não existe lista de trabalho definida	Defina uma lista de trabalho com as amostras a serem lidas
7024	Não foi introduzido nome para amostra	Identifique as amostras na lista
7025	Não existe ensaios definidos	Defina ensaio HIV quantitativo
7026	Erro nos resultados. Resultados não calculados para esta amostra	Dados incompletos. Faltou tubo na leitora. Corra uma lista de trabalho antes. Não existe mais dados para serem calculados
7037 a 7038	Nenhuma amostra foi selecionada para a deleção	Caso tenha certeza que quer deletar amostra selecione-a com a barra de espaço. Apenas amostras não processadas podem ser selecionadas
7039	Sem espaço para adicionar amostra no carrossel	O carrossel está cheio analise os tubos em uma nova lista
7040 a 7048	Erro de Software	Chame a assistência técnica
7049 a 7050	ID do usuário inválido	Introduza um nome válido
7055 a 7057	Erro de configuração	Chame a assistência técnica
7059	Lista de trabalho já foi abortada	Você está tentando abortar uma lista que não está mais correndo. O instrumento está disponível.
7060 a 7062	Erro de path	Chame a assistência técnica
7063	Dados da amostra não são válidos	Chame a assistência técnica
7064	Gráficos não disponíveis para amostra	Tubo ainda não foi lido
7065	Não pode selecionar tubo de solução de referência RS	Cancele a operação
7066	Não pode selecionar tubo de ensaio negativo AN	Cancele a operação
7067	Nenhum resultado para este ensaio	Cancele a operação
7068	Nenhum usuário foi selecionado	Usa a tecla de espaço para selecionar
7069	Nenhum nível foi selecionado	Usa a tecla de espaço para selecionar
7072	Erro de Software	Chame a assistência técnica
7073	Não pôde deletar o nível	Delete todos os usuários deste nível primeiro
7074	Janela de fundo não abre	Aguarde

<b>CÓDIGO DE ERROS</b>	<b>CAUSAS</b>	<b>PROCEDIMENTOS</b>
7075	Tempo de conexão do usuário foi expirado	Logar-se novamente
7076	Erro de identificação	Identifique corretamente as amostras. Assegure-se de não repetir ID
7081 a 7086	Erro de preferências	Chame a assistência técnica
7087	Incapaz de abrir um arquivo de tela	Chame a assistência técnica
7088	Erro de Software	Chame a assistência técnica
7089	Incapaz de achar ou abrir arquivo	Verifique nome do arquivo
7090	A tela PrintScreen está desabilitada neste programa	
7091 a 7095	Erro de comunicação	Verifique os cabos de ligação ou se os equipamentos estão ligados
7096	Primeira amostra. Nenhuma amostra anterior	Cancele a operação
7097	Última amostra. Nenhuma amostra posterior	Cancele a operação
7098	Primeiro ensaio. Nenhum ensaio anterior	Cancele a operação
7099	Último ensaio. Nenhum ensaio posterior	Cancele a operação
8001 a 8006	Erro de configuração	Chame a assistência técnica
8007 a 8009	Sintaxe incorreta do arquivo no diretório atual	Foi escolhido um nome de arquivo inválido. Escolha um correto
8009	Nenhum parâmetro selecionado. Não pode iniciar corrida.	Selecione um parâmetro antes de iniciar a corrida
8010	Nenhum dado anterior para ver	Cancele a operação
8011	Parâmetro IRS não é editável	Cancele a operação
8012	Nenhum parâmetro para deletar	Cancele a operação
8013	Velocidade do vortex é 0	Chame a assistência técnica
8014	Parâmetro digitado tem sintaxe incorreta	Foi escolhido um nome de arquivo inválido. Escolha um correto
8015 a 8018	Erro de software	Chame a assistência técnica
8020	Arquivo de dados cheio	Cancele a operação
8021	Conjunto de parâmetro está na revisão errada	Cancele a operação, volte ao estágio anterior
8022	Conjunto de parâmetro não existe	Cancele a operação volte ao estágio anterior
8023	Variáveis do conjunto de parâmetros não válidos	Chame a assistência técnica
8024	Parâmetros não válidos	Chame a assistência técnica

<b>CÓDIGO DE ERROS</b>	<b>CAUSAS</b>	<b>PROCEDIMENTOS</b>
8026	Deletando conjunto de parâmetros do ensaio atual	Aguarde
8027	Dados do teste não existem	Escolha o teste correto
8028	Seqüência não existe. Não pôde correr o teste	Selecione seqüência antes de iniciar corrida
8029 a 8038	Erro de instrumento	Chame a assistência técnica
8039	Tubo inicial deve ser maior que 0	Refaça o tubo RS
8040	Réplica é maior que número total ou tubos processados	Confira todas as duplicatas
8041 a 8045	Erro de Software	Chame a assistência técnica
8046	Número total de tubos processados é menor que dois	Coloque os tubos no carrossel
8047	Vendo o primeiro conjunto de dados disponíveis. Não existem mais dados anteriores	Aguarde você fez uma opção inválida
8048	Vendo o último conjunto de dados disponíveis. Não existem mais dados	Aguarde você fez uma opção inválida
8049	Relatório não pôde ser impresso. Verifique a impressora	Verifique os cabos de ligação, ou se os equipamentos estão ligados
8050	A voltagem do PMT é 0	Chame a assistência técnica
8051	Não pode ver dados da corrida atual, teste não completado.	Aguarde
8052 a 8054	Erro APR	Chame a assistência técnica
9001 9057	Erro de protocolo de comunicação	Verifique os cabos de ligação, ou se os equipamentos estão ligados
11011	Sem cleaning solution	Coloque cleaning solution no instrumento
11012	Sem ECL Buffer solution	Coloque Assay Buffer no instrumento
11013	Alta célula	Chame a assistência técnica
11021	Parâmetros de análise incorretos	Chame a assistência técnica
11022	Sem ECL Buffer solution	Coloque Assay Buffer no instrumento
11023	Alta célula	Chame a assistência técnica
11024	Sem cleaning solution	Coloque cleaning solution no instrumento
11041 a 11053	Falha na medida do fluxo	Execute o check flow rate
11054	Standby detectou frasco de cleaning solution vazio	Coloque cleaning solution no instrumento
11055	Standby detectou frasco de Assay Buffer vazio	Coloque Assay Buffer no instrumento

<b>CÓDIGO DE ERROS</b>	<b>CAUSAS</b>	<b>PROCEDIMENTOS</b>
12000	Usuário interrompeu a corrida	Continue o teste
12001	Usuário abortou a corrida	Inicie novamente o teste
12011 a 12022	Incompatibilidade de instrumentos	Não troque os instrumentos, PC, leitora e impressora
12100	Erro de Software	Chame a assistência técnica
12101	Menos que duas amostras na lista de trabalho	Coloque os tubos no carrossel
12102	Falta de um tubo no carrossel	Coloque o tubo no carrossel
12103	Posição incorreta do carrossel	Ajuste o carrossel na posição correta
12104	Falha no tubo de solução de referência	Faça um novo tubo RS
12105	Falha no tubo negativo do ensaio	Faça um novo tubo AN
12106	Sistema deve ser inicializado	Execute Prime
12107	Sistema deve ser inicializado através do quick prime	Execute o quick Prime
12108 a 12119	Incompatibilidade de instrumentos	Não troque os instrumentos, PC, leitora e impressora
12201 a 12301	Alarmes de instrumentos	Chame a assistência técnica
12301	Fator de diluição irreconhecível	Faça uma diluição válida
12302	Erro de detecção do ECL	Chame a assistência técnica
12303	Chamada de ensaio errado	Opção inválida
12304	Chamada de redução de dados quando os tubos não foram lidos	Aguarde a leitura dos tubos terminar
12305 a 12306	Erro de RS	Faça um novo tubo RS e corra novamente
12307 a 12308	Erro de AN	Faça um novo tubo NA e corra novamente
12309	Sinal da amostra muito alto	Aumente o fator de diluição e repita a detecção
12310	Sinal do Qc muito alto	Chame a assistência técnica
12311	Nenhum dos calibradores estão bons	Refaça a detecção após ter feito a hibridização
12401	Índice da taxa de fluxo muito baixo	Chame a assistência técnica
12402	Índice da taxa de fluxo muito baixo	Verifique e corrija o check flow rate
12501	Encontrado dados insuficientes	Aguarde o término do teste
30301 a 30318	Erro de software e ou instrumento	Chame a assistência técnica

## 9. Contatos com a bioMérieux

### **Assistência Técnica - 0800264848**

#### **Assessoria Científica:**

**Linda Khalili Boukai – 21 -7813-1930**

**Ana Maria dos S. Ferreira- 85- 9101-6785**

#### **Gerência de Produto**

**Rogéria Campos – 21 – 2444 –1326**

**bioMérieux Brasil S.A. – 21- 2444-1400**

**Estrada do Mapuá, 491 Jacarepaguá,**

**CEP 22710-261**

**Rio de Janeiro**

## 10. Referências Bibliográficas

- 1) NASBA HIV-1 RNA QT. Manual de Instruções para utilização do produto.
- 2) Boom, R. Sol, CJA, Salimans, MMM, e cols. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Micr. 1990. 28: 495-503.
- 3) van Buul, C. Cuyppers, H. e cols. O NucliSens Extractor para Isolamento. Infusion Therapy. 1998. 25: 147-151
- 4) Manual de Carga Viral. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas da Saúde. Coordenação Nacional de DST e AIDS. 1999
- 5) Ginocchio C.C., Kemper, M. e cols. Multicenter evaluation of the performance characteristics of the NucliSens HIV-1 QT Assay Used for Quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA. J. Clin. Micr. 2003. 41:164-173.

## A ROCHE NO MUNDO

A F.Hoffmann-La Roche AG, conhecida simplesmente por Roche, é uma empresa internacional que se dedica à saúde do homem. Foi fundada em 1896, em Basileia, na Suíça, por Fritz Hoffmann (1868-1920), juntamente com sua esposa, Adèle La Roche, que notaram entre a classe médica e a população uma necessidade crescente de medicamentos de alta qualidade, com níveis constantes de eficácia terapêutica e excelente confiabilidade.

## A ROCHE NO BRASIL

No Brasil, a Roche iniciou suas operações em 14 de março de 1931. Inicialmente contava com 17 funcionários instalados em um prédio de 250 m<sup>2</sup> no centro do Rio de Janeiro. Desde então a empresa cresceu imensamente em número de funcionários, instalações, negócios e investimentos no país, aumentando sensivelmente sua participação no cotidiano brasileiro.

Como em outros países do mundo a Roche no Brasil está dividida em 3 unidades de negócio: Farmacêutica, Roche Consumer Health e Diagnóstica.

## A DIVISÃO DIAGNÓSTICA

Em seus centros de pesquisa e de produção na Suíça, Alemanha, Áustria e nos Estados Unidos, a Roche desenvolve e produz sistemas de diagnóstico laboratorial, que são comercializados por suas afiliadas em cerca de 40 países.

Estes sistemas são compostos por uma ampla variedade de "kits" que utilizados dentro de aparelhos automatizados, produzidos com tecnologia de ponta na área mecano-eletrônica, auxiliam o laboratório na obtenção de resultados mais rápidos, mais precisos e mais reprodutíveis.

Além de suas conhecidas linhas de Bioquímica, Imunologia, Hematologia e Uroanálise, a Roche Diagnóstica foi pioneira no desenvolvimento, padronização e comercialização de uma metodologia que hoje se tornou sinônimo de diagnóstico por biologia molecular - a **PCR (Polymerase Chain Reaction)**.

## DUAS DÉCADAS DE PCR

A Roche tornou a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) um padrão de referência entre as tecnologias baseadas na detecção de DNA para o diagnóstico de doenças, incluindo o monitoramento da carga viral de pacientes com AIDS..

A tecnologia, elaborada por K. Mullis e desenvolvida pela equipe de cientistas da Cetus Corporation, foi publicada pela primeira vez em 1985, na revista Science, e foi aclamada como uma das mais poderosas ferramentas da biologia molecular. Por esta revolucionária descoberta, o Dr. Mullis ganhou o Prêmio Nobel de Química em 1993.

O portfólio de produtos da Roche oferece uma gama de opções, incluindo kits para diagnóstico in vitro e instrumentos. Como parte de uma solução integrada para cuidado da saúde, nossos produtos baseados na tecnologia da PCR permitem aos médicos monitorar o desenvolvimento das doenças de seus pacientes e a resposta dos mesmos à terapia. Atualmente a Roche Molecular vem implantando seus novos sistemas baseados na PCR em Tempo Real, atendendo às necessidades dos laboratórios clínicos, pesquisas e análise de alimentos.

Neste manual, você terá informações sobre a técnica de biologia molecular mais utilizada nos laboratórios do mundo, obtendo informações detalhadas do procedimento para a realização do teste de carga viral do HIV.



## 1. PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

### O que é PCR?

A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é uma técnica *in vitro* que reproduz a capacidade natural de replicação do DNA. É uma tecnologia patenteada que gera múltiplas cópias de uma seqüência específica de nucleotídeos de um determinado organismo.

A PCR constitui um mecanismo para detectar, com alta especificidade, concentrações extremamente baixas de determinados organismos.

A tecnologia elaborada por K. Mullis e desenvolvida pela equipe de cientistas da Cetus Corporation, foi publicada pela primeira vez em 1987, na revista Science, por R. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. Mullins, C. Horn, H. Erlich, N. Arnheim (Amplificação enzimática das seqüências genômicas da  $\beta$ -globina e análises do sítio de restrição das células da anemia falciforme, Science 230:1350-1354, 1985) e foi aclamada como uma das mais poderosas ferramentas da biologia molecular. Por esta revolucionária descoberta, o Dr Mullis ganhou o Prêmio Nobel de Química em 1993.

Dentre as mais importantes aplicações da PCR estão a arqueologia, medicina forense, testes de paternidade, genética, pesquisa biológica e diagnóstico clínico.

Nos diagnósticos clínicos, os cientistas podem extrair o material genético de uma amostra pesando apenas um trilhonésimo de um grama, copiar sua seqüência genética muitas e muitas vezes e obter material suficiente para detectar a presença de um vírus específico, bactéria ou material genético que sofreu mutação. Esse processo de amplificação permite ao laboratorista detectar a presença de vírus e bactérias no plasma ou em outros fluidos do paciente e, em alguns casos, medir a carga viral (quantificar) do agente patogênico.

Os testes baseados na técnica da PCR consistem basicamente de 3 etapas:

- 1) Extração: na etapa da extração ocorre a quebra da capa proteica viral e exposição do material genético.

- 2) Amplificação: durante a etapa de amplificação o material genético extraído é amplificado dando origem a bilhões de cópias idênticas ao original.
- 3) Detecção: a etapa de detecção consiste em um processo de ELISA, sendo que a carga viral detectada é diretamente proporcional a coloração obtida.

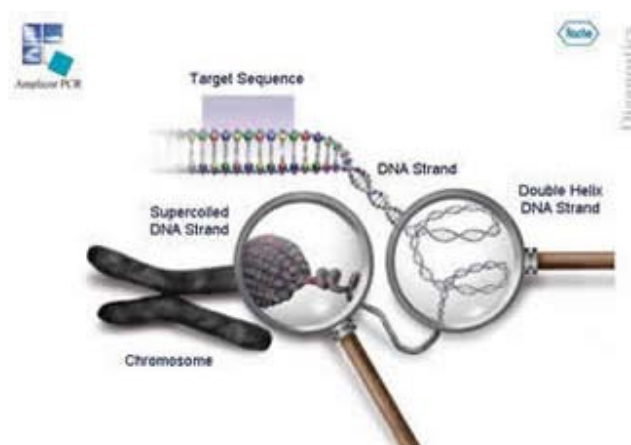


Figura 1: A PCR amplifica uma seqüência-alvo

### Princípios e Procedimentos

O Teste COBAS AMPLICOR HIV-I MONITOR, baseia-se em cinco processos principais: preparação da amostra; transcrição reversa do RNA-alvo para produzir DNA complementar (cDNA); amplificação por PCR do cDNA-alvo, usando iniciadores específicos complementares para o HIV-1; hibridização dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas do(s) alvo(s); e detecção dos produtos amplificados e ligados a sonda por determinação colorimétrica.

O Teste COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR, permite uma transcrição reversa e amplificação por PCR simultânea do HIV- 1 e do RNA do Padrão de Quantificação do HIV-1. O reagente de Mistura Principal contém um par de iniciadores específicos para o RNA do HIV-1 e para o RNA do Padrão de Quantificação do HIV-1, tendo sido desenvolvido

para facultar uma quantificação equivalente dos subtipos do HIV-1 do grupo M. Não se determinaram as características de desempenho do Teste com amostras do Grupo O.

A quantificação do RNA viral do HIV-1 é efetuada utilizando o Padrão de Quantificação do HIV-1. O Padrão de Quantificação do HIV-1 é uma cópia transcrita de RNA não infecciosa que contém locais de ligação ao iniciador idênticos aos do RNA do HIV-1 alvo e uma região única de ligação que permite que o amplicon do Padrão de Quantificação se distinga do amplicon do HIV-1. O Padrão de Quantificação do HIV-1 encontra-se incorporado em cada amostra individual, num número de cópias conhecido e transportado através dos passos de preparação, transcrição reversa, amplificação por PCR, hibridização e detecção da amostra em conjunto com o HIV-1 alvo e é amplificado em conjunto com o HIV-1 alvo. O analisador COBAS AMPLICOR calcula os níveis de RNA do HIV-1 presentes nas amostras de teste comparando o sinal do HIV-1 com o sinal do Padrão de Quantificação em cada amostra.

O Padrão de Quantificação compensa os efeitos de inibição e controla o processo de amplificação visando permitir uma quantificação rigorosa do RNA do HIV-1 presente em cada amostra.

#### Preparação da Amostra - Extração do Material Genético

Pelo método Standard o RNA do HIV-1 é isolado diretamente do plasma por lise de partículas virais com um agente caotrópico, seguido por precipitação do RNA com álcool. Com o método Ultra-sensível de preparação da amostra, as partículas virais do HIV-1 no plasma são primeiramente concentradas por centrifugação a alta velocidade, seguidas por lise de partículas virais com um agente caotrópico, seguido por precipitação do RNA do HIV-1 com álcool. Introduce-se um número conhecido de moléculas de Padrão de Quantificação do RNA em cada amostra, em conjunto com o reagente de lise. O Padrão de Quantificação do HIV-1 é processado através dos passos de preparação, transcrição reversa, amplificação e detecção da amostra e é usado para quantificação do RNA do HIV-1 presente na amostra de teste.

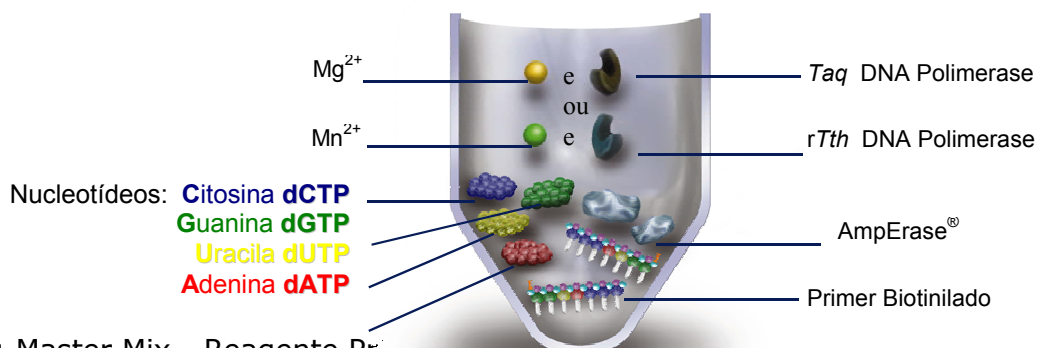


Figura 2: Master Mix - Reagente Pr

### Transcrição Reversa e Amplificação por PCR - Seleção do Alvo

A seleção da sequência de RNA alvo do HIV-1 depende da identificação de regiões dentro do genoma do HIV-1 que apresentem uma conservação máxima da sequência. Por conseguinte, a seleção adequada dos iniciadores e da sonda é essencial para que o teste tenha capacidade para detectar o genótipo do HIV-1. O Teste COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR, usa os iniciadores SK145 e SKCC1B para definir uma sequência de 155 nucleotídeos dentro da região altamente conservada do gene gag do HIV-1. A região gag codifica os antígenos específicos de grupo, ou proteínas estruturais do núcleo do vírus. Em regra, os genes gag do HIV-1 apresentam uma extensão de aproximadamente 1500 nucleotídeos, estando localizados sensivelmente nas posições 789 a 2290 do genoma do HIV. A sequência de nucleotídeos dos iniciadores foi aperfeiçoada para permitir uma amplificação equivalente dos subtipos do HIV-1 do Grupo M.

#### - Transcrição Reversa

As reações de transcrição reversa e de amplificação por PCR são efetuadas no termociclador utilizando a enzima termoestável recombinante *Thermus thermophilus* DNA Polimerase (rTth pol). Na presença de manganês e sob condições de tamponamento adequadas, a rTth pol apresenta um atividade simultaneamente de transcrição reversa e de polimerase do DNA. Isto permite que a transcrição reversa e a amplificação por PCR ocorram na mesma mistura de reação.

As amostras processadas são adicionadas à mistura de amplificação em tubos de amplificação (tubos-A) nos quais ocorrem a transcrição reversa e a amplificação por PCR. O iniciador à jusante, ou antisense (SKCC1B), e o iniciador à montante, ou sense (SK145), são biotinizados nas extremidades 5'. A reação é aquecida para permitir que o iniciador à jusante se ligue especificamente ao RNA alvo do HIV-1 e ao RNA do Padrão de Quantificação do HIV-1. Na presença de  $Mn^{2+}$  e de trifosfatos de desoxinucleósidos em excesso (dNTPs), incluindo trifosfatos de desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxicidina e desoxiuridina e desoxitimidina, a rTth pol alonga o iniciador ligado formando uma cadeia de DNA (cDNA) complementar ao RNA-alvo.

#### - Amplificação do Alvo

Após a transcrição reversa do RNA do HIV-1 alvo e do Padrão de Quantificação do RNA do HIV-1, a mistura de reação é aquecida para desnaturar o híbrido RNA:cDNA e expôr as sequências-alvo do iniciador. À medida que a mistura aquece, o iniciador a montante (SK145) liga-se especificamente à cadeia de cDNA, a rTth pol alonga o iniciador, e ocorre a síntese de uma segunda cadeia de DNA. Isto completa o primeiro ciclo de PCR dando origem a uma cópia de DNA de dupla cadeia da região alvo de RNA do HIV-1 e de RNA do Padrão de Quantificação do HIV-1. A mistura de reação é novamente aquecida para separar a dupla cadeia de DNA resultante e expôr as sequências-alvo do iniciador. A medida que a mistura aquece, os iniciadores SK145 e SKCCIB ligam-se ao DNA alvo. A rTth pol, na presença de  $Mn^{2+}$  e de dNTPs em excesso, alonga os iniciadores ligados ao longo dos modelos-alvo para produzir uma molécula de DNA de dupla cadeia com 155 pares de bases, denominada amplicon. O analisador, COBAS AMPLICOR repete automaticamente este processo durante um determinado número de ciclos, cada um duplicando eficazmente a quantidade de DNA amplicon. A amplificação ocorre apenas na região do genoma do HIV-1 que se encontra entre os iniciadores; não é amplificado a totalidade do genoma do HIV-1.

### Reação de Hibridização

Após amplificação por PCR, o Analisador COBAS AMPLICOR acrescenta automaticamente a Solução de Desnaturação aos tubos-A e o amplicon do HIV-1 e o amplicon do Padrão de Quantificação do HIV-1 são desnaturados quimicamente para formar um DNA de cadeia simples.

Para se obterem resultados quantitativos ao longo de um grande limite dinâmico, o Analisador COBAS AMPLICOR dilui em série o amplicon desnaturado em tubos de detecção (tubos-D). Uma suspensão de partículas magnéticas revestidas por uma sonda oligonucleotídica específica para o amplicon do HIV-1 (SKI02) e para o amplicon do Padrão de Quantificação do HIV-1 (CP35) é acrescentada a cada uma de quatro diluições de amplicon do HIV-1 e a cada uma de duas diluições do amplicon do Padrão de Quantificação do HIV-1, respectivamente. Os amplicons biotinilados são hibridizados com as sondas oligonucleotídicas específicas do alvo que se encontram ligadas às partículas magnéticas. Cada determinação quantitativa requer quatro medições separadas de reagente de absorvância, utilizando a solução de suspensão da sonda do HIV-1 e duas medições de absorvância utilizando a solução de suspensão da sonda do Padrão de Quantificação do HIV-1.

### Reação de Detecção

Após a reação de hibridização, o Analisador COBAS AMPLICOR lava as partículas magnéticas no tubo-D para remover qualquer material não ligado, após isso se adiciona Conjugado Avidina-Peroxidase de rábano picante. O Conjugado Avidina-Peroxidase de rábano picante liga-se ao amplicon biotinilado hibridizado com as sondas oligonucleotídicas específicas para o alvo, que se encontram ligadas as partículas magnéticas. O Analisador COBAS AMPLICOR remove o conjugado não ligado através da lavagem das partículas magnéticas e, então, uma solução de substrato contendo peróxido de hidrogênio e 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) é acrescentada a cada tubo-D. Na

presença de peróxido de hidrogênio, a peroxidase de rábano picante com partículas ligadas, catalisa a oxidação de TMB para formar um complexo colorido cuja absorbância é medida pelo Analisador COBAS AMPLICOR a um comprimento de onda de 660 nm.

### Ilustração da Metodologia do Teste Cobas Amplicor HIV-1 Monitor v1.5

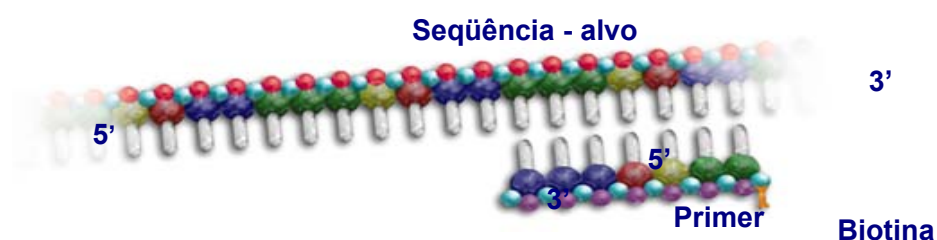


Figura 3: Etapa 1 - Transcrição Reversa - Primer biotilado liga-se à seqüência RNA-alvo.

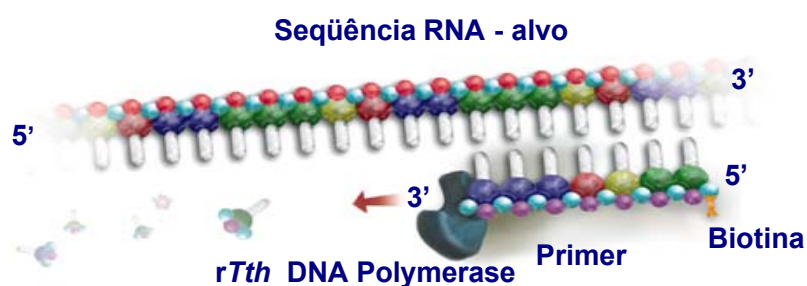


Figura 4: Etapa 2 - Transcrição Reversa - rTth DNA polimerase catalisa extensão do primer pela incorporação dos nucleotídeos complementares.

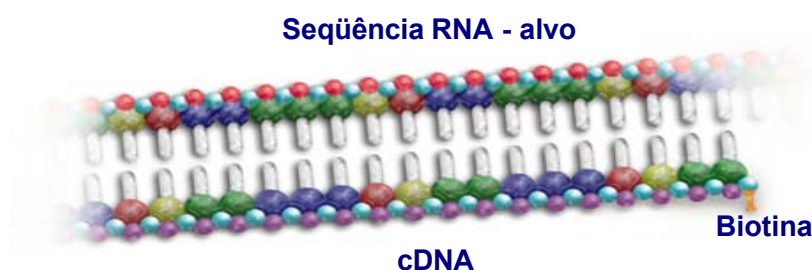


Figura 5: Etapa 3 - Final da transcrição reversa - resulta na síntese do DNA complementar (cDNA) da seqüência do RNA-alvo.

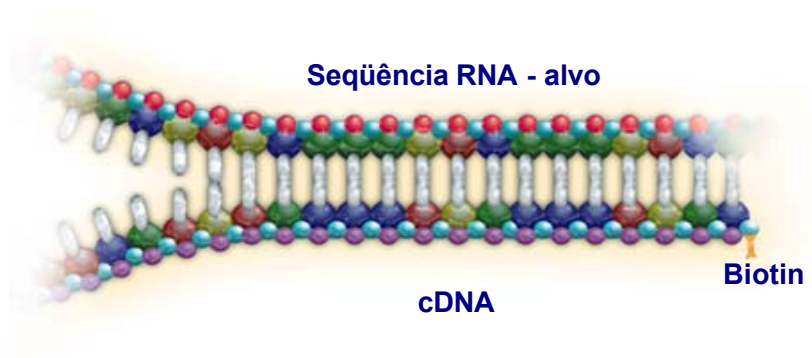


Figura 6: PCR - Etapa 1 - Desnaturação por aquecimento.

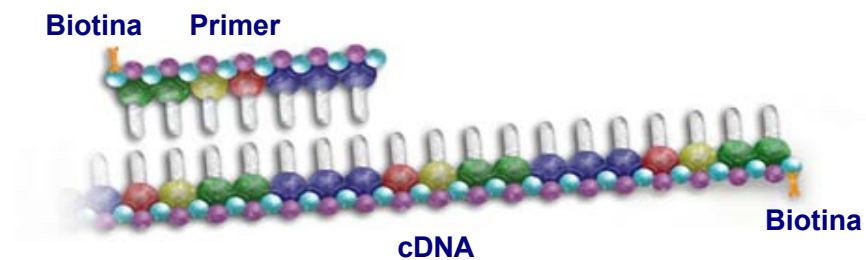


Figura 7: PCR - Etapa 2 - O primer liga-se ao cDNA.

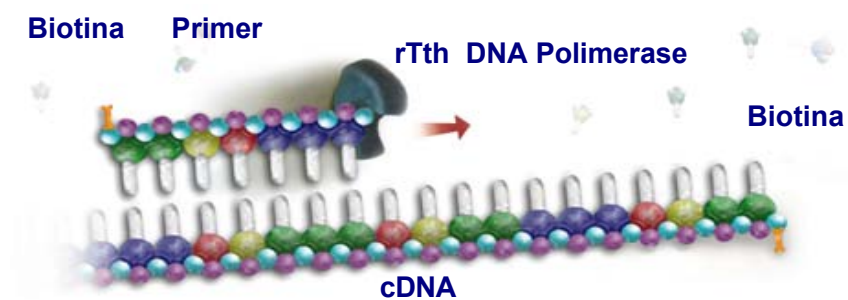




Figura 8: PCR - Etapa 3 - A rTth DNA Polimerase catalisa a extensão do primer.

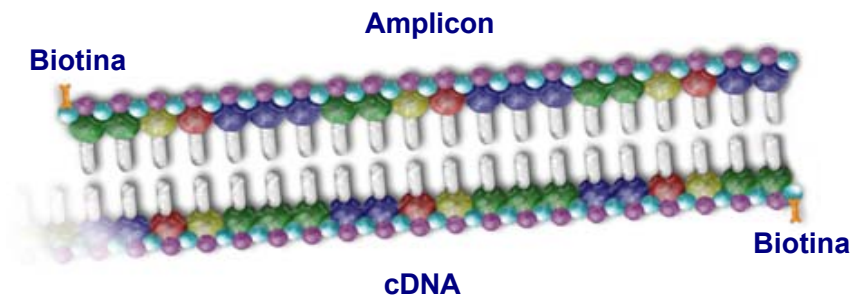


Figura 9: Final do primeiro ciclo da PCR - Produção da dupla fita de DNA (Amplicon).

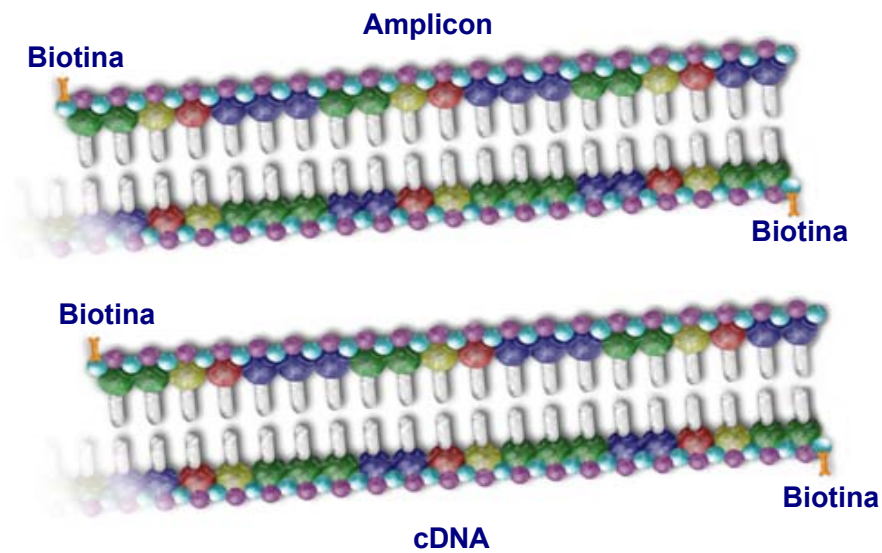


Figura 10: Final do segundo ciclo da PCR - A rTth DNA polimerase catalisa a extensão do primer.

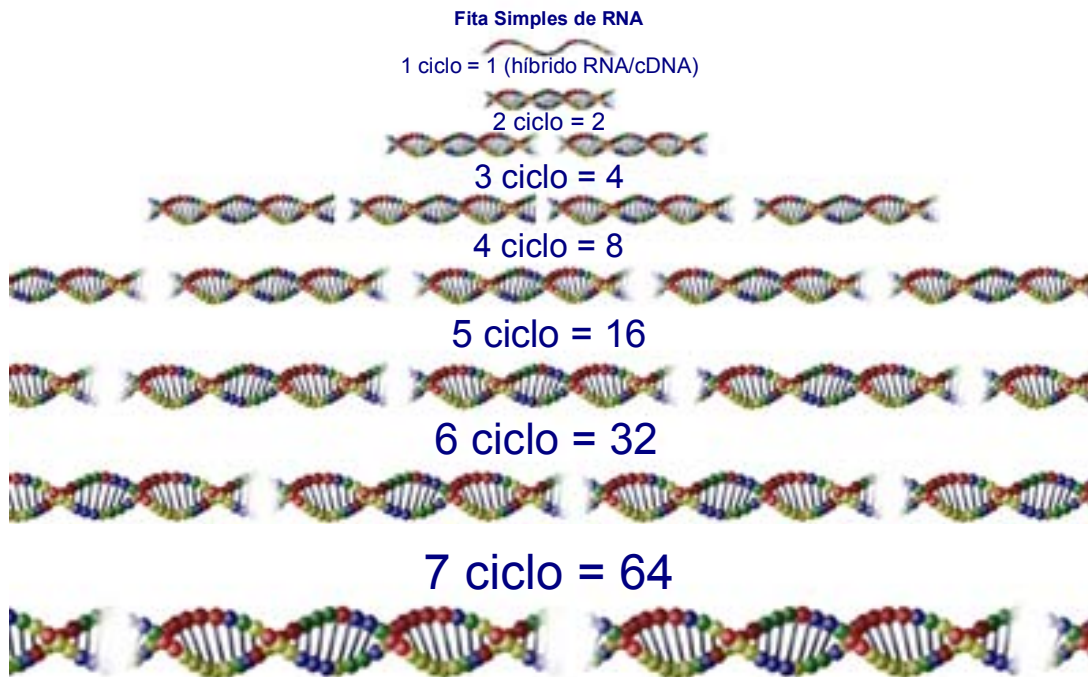


Figura 11: PCR - Amplificação Exponencial. A cada novo ciclo dobra a quantidade do alvo, resultando em um aumento exponencial de Amplicon.

## 2. Apresentação dos Kits e Equipamentos

### Apresentação dos Kits

O teste Cobas Amplicor HIV Monitor é um teste de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro* destinado à quantificação do RNA do vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1), no plasma humano. Através deste teste é possível determinar o RNA do HIV-1 numa concentração de 50 a 750.000 cópias/mL.

O kit Cobas Amplicor HIV Monitor v1.5 fornece reagentes para um total de 48 testes e é apresentado como uma única caixa, a qual contém 2 outras caixas, uma contendo os reagentes de amplificação, reagentes de preparação das amostras e controles e reagentes específicos de detecção e a outra caixa que contém os reagentes genéricos de detecção.

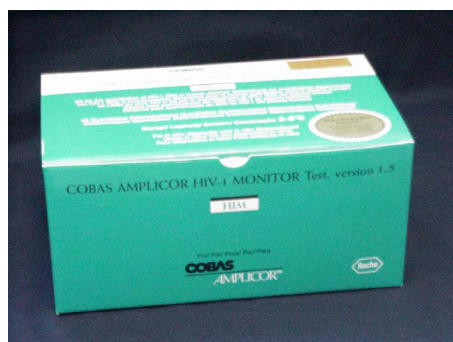


Figura 12: Foto do kit Cobas Amplicor HIV-1 Monitor v1.5.

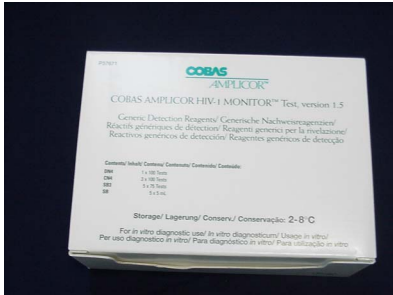


Figura 13: Foto da caixa fechada de reagentes genéricos.

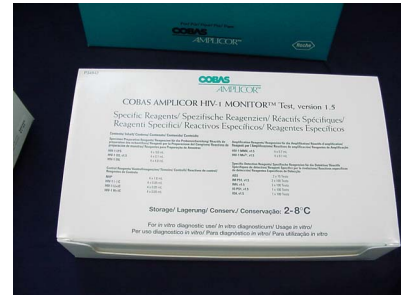


Figura 14: Foto da caixa fechada de reagentes específicos.



Figura 15: Foto da caixa aberta de reagentes genéricos.



Figura 16: Foto da caixa aberta reagentes de reagentes específicos.

O kit Cobas Amplicor Wash Buffer é composto por duas garrafas contendo, cada uma, tampão de lavagem 10 vezes concentrado para ser usado no analisador Cobas Amplicor para realização do teste Cobas amplicor HIV-1 Monitor v1.5.



Figura 17: Foto do kit Cobas Amplicor Wash Buffer.

### Armazenamento e Conservação dos Kits

- Não congelar os reagentes.
- Armazenar HIV-1 LYS, HIV-1 QS v1.5, HIV-1 DIL, HIV-1 MMX v1.5, HIV-1 Mn<sup>2+</sup>, NHP, HIV-1 (-)C, HIV-1 L(+)C e HIV-1 H(+)C de 2-8°C. Estes reagentes são estáveis até a data de validade indicada. Uma vez abertos, qualquer porção não utilizada deve ser descartada.
- Armazenar AD3 e DN4 de 2-25°C. Uma vez cadastrados no analisador Cobas Amplicor, AD3 e DN4 são estáveis por 30 dias de 2-8°C ou até a data de validade (o que vier primeiro). Estes reagentes podem ser usados por, no máximo, 4 ciclos no analisador (24 horas por ciclo) e devem ser armazenados de 2-8°C entre os ciclos.
- Armazenar CN4 de 2-8°C. Uma vez cadastrado no analisador Cobas Amplicor, CN4 é estável por 30 dias de 2-8°C ou até a data de validade (o que vier primeiro). Este reagente pode ser usado por, no máximo, 4 ciclos no analisador (24 horas por ciclo) e deve ser armazenado de 2-8°C entre os ciclos.

- Armazenar SB3 e SB de 2-8°C. Estes reagentes são estáveis até a data de validade indicada. Uma vez adicionado o SB no SB3, o cassete de reagente é estável por 16 horas no analisador. Não expor SB3, SB ou o cassete preparado a metais, agentes oxidantes ou à luz direta.
- Armazenar IM PS1 v1.5 e IM4 v1.5 de 2-8°C. Estes reagentes são estáveis até a data de validade indicada. Uma vez adicionado o IM PS1 v1.5 no IM4 v1.5, o cassete de reagente é estável por 14 dias de 2-8°C. O cassete preparado pode ser usado por, no máximo, 2 ciclos no analisador (24 horas por ciclo) e deve ser armazenado de 2-8°C entre os ciclos.
- Armazenar IQ PS1 v1.5 e IQ4 v1.5 de 2-8°C. Estes reagentes são estáveis até a data de validade indicada. Uma vez adicionado o IQ PS1 v1.5 no IQ4 v1.5, o cassete de reagente é estável por 30 dias de 2-8°C. O cassete preparado pode ser usado por, no máximo, 4 ciclos no analisador (24 horas por ciclo) e deve ser armazenado de 2-8°C entre os ciclos.
- Armazenar WB de 2-8°C. WB é estável até a data de validade indicada. O tampão preparado (diluindo WB 1:10 com água destilada ou deionizada) deve ser armazenado de 2-25°C no reservatório de tampão do Cobas Amplicor e é estável por 2 semanas a partir da data de preparo.

### Apresentação do Equipamento

O analisador Cobas Amplicor é um analisador clínico automatizado para ser usado em procedimentos de teste de diagnóstico *in vitro* qualitativos e quantitativos usando os reagentes Cobas Amplicor e/ou Cobas AmpliScreen.

O analisador Cobas Amplicor combina cinco instrumentos (pipetador, termociclador, incubadora, estação de lavagem e fotômetro) num único sistema e automatiza os processos de amplificação e detecção.

### Características do Cobas Amplicor:

- Sistema analisador automatizado, de bancada;
- Automatiza três processos: amplificação do ácido nucléico; hibridização do produto amplificado com sonda específica; detecção do produto amplificado, ligado à sonda, pela formação de cor;
- Reduz necessidade de intervenção do operador durante o teste;
- Processa diferentes testes simultaneamente;
- *Multiplex testing*: detecção múltipla a partir de uma única amostra amplificada;
- *Reflex testing*: testes adicionais pré-selecionados;
- Executa a entrada dos dados por código de barras;
- Controles negativo e positivo;
- Protocolos padronizados: garantia de sensibilidade e especificidade da PCR;
- Pipetagem e adição de reagentes automáticas;
- Realiza amplificação e detecção em paralelo;
- Amplifica e detecta até 48 amostras simultaneamente;
- Cada termociclador (capacidade - 12 amostras) pode amplificar testes diferentes simultaneamente;
- Monitora os reagentes em uso e descartáveis;
- Verifica a validade dos reagentes em uso por código de barras;
- Opera *overnight*;
- Previne contaminação ambiental pela enzima AmpErase;
- Utiliza tubos de amplificação e de reagentes fechados, evitando a evaporação dos mesmos;
- Utiliza controle interno para amostras negativas.



Figura 18: Foto do equipamento Cobas Amplicor.

#### Dimensões e Peso do Equipamento:

- Peso: 75 Kg
- Largura: 86 cm
- Profundidade: 57 cm
- Altura (tampa fechada): 41 cm
- Altura (tampa aberta): 90 cm

#### Especificações:

Para um desempenho ótimo do analisador Cobas Amplicor, os requisitos ambientais deverão estar em conformidade com as seguintes especificações:

- Temperatura ambiente entre 15 e 32°C.
- Umidade relativa inferior a 80% a 32°C.
- Altitude inferior a 3000 metros.



### 3. Material Necessário Para a Tecnologia da PCR

#### Materiais de consumo, equipamentos e acessórios fornecidos pelo fabricante

##### Área 1 – Pré-Amplificação

- Centrífuga refrigerada (para rotação de 23.600 x g)
- Agitador de tubos (vortex)
- Pipetas automáticas de 20 µL, 200 µL e 1000 µL
- Ponteiras com filtros, estéreis e Rnase-free, de 20 µL, 200 µL e 1000 µL
- Pipetas sorológicas de poliestireno, estéreis, de 10 mL
- Tubos de 2,0 mL, tipo Eppendorf, estéreis e com tampa de rosca
- Tubos cônicos de 50 mL, com tampa
- Transfer tips (pipeta tipo Pasteur) estéreis, de ponta fina e "Rnase-free"
- A-Rings

##### Área 2 – Pós-Amplificação

- Cobas Amplicor
- Nobreak
- Impressora
- D-Cups
- Pipetas sorológicas de poliestireno, estéreis, de 10 mL

#### Materiais de consumo, equipamentos e acessórios não fornecidos pelo fabricante

- Fluxo laminar (opcional)
- Geladeira (área Pré-Amplificação)
- Geladeira (área Pós-Amplificação)
- Luvas sem talco
- Jaleco
- Sapatilha (pró-pé)
- Proveta (para preparo do Wash Buffer)
- Água destilada ou deionizada
- Isopropanol e etanol absolutos
- Estante para tubos de 2,0 mL

#### 4. Procedimento Para a Realização do Teste.

**Antes de iniciar o procedimento seguir rigorosamente as observações abaixo:**

- Na técnica da PCR sempre usar luvas **sem** talco para evitar inibição da enzima.
- **Todo** procedimento de extração deverá ser realizada com ponteiras com barreira.
- Antes de iniciar a extração e após o término da extração, limpar as pipetas e fluxo laminar ou a superfície da bancada, usando hipoclorito 0,5% e em seguida etanol 70%. O responsável pela realização da técnica deverá sempre vestir um jaleco exclusivo para a área 1 e usar luvas sem talco.
- Preparar a área para a extração.
- Caso o Laboratório não tenha fluxo laminar, deverá usar óculos protetores e máscara, como em qualquer rotina laboratorial.
- Deixar os reagentes e amostras a temperatura ambiente
- Limpar a superfície da bancada ou fluxo laminar e pipetas P20, P200 e P1000, com hipoclorito 0,5% e depois com etanol 70%.
- Deixar disponível na bancada as ponteiras com filtro 20 µL, 200 µL e 1000 µL.
- Fazer a lista de trabalho, colocando o nome do teste, data, lote, validade do kit, número do A-ring, nome do operador.
- Seguir passo a passo o procedimento do teste que está sendo realizado.
  
- Quando terminar de colocar a amostras nos A-tubes com Master Mix, tirar o jaleco e trocar as luvas, levar o A-ring dentro do saco plástico (o mesmo que vem o A-ring na caixa) para a área 2 - Amplificação e detecção, onde está o Cobas Amplicor. **NÃO**

- **VOLTAR PARA A ÁREA 1 Pré PCR**
- Vestir o jaleco exclusivo da área 2
- Preparar o Cobas Amplicor seguindo o checklist
- O fluxo de trabalho no laboratório deve ser realizado de uma forma unidirecional, começando na área de Pré-amplificação e passando para a área Pós-Amplificação (Amplificação/Detecção). Os procedimentos na área de Pré-Amplificação têm que ser iniciado com a preparação do Master Mix e continuar com a preparação das amostras. Os materiais e equipamentos devem ser exclusivos de cada área e não devem ser utilizados para outros procedimentos nem transportados entre as áreas. Luvas devem ser utilizadas em cada área e substituí-las quando mudar da área 1 para a área 2. Os materiais da área 2 sempre deverão permanecer na área 2 Pós-amplificação.

**A) Preparação do Master Mix (pré-amplificação – área 1): (área 1A - Caixa para preparar o Master Mix).**

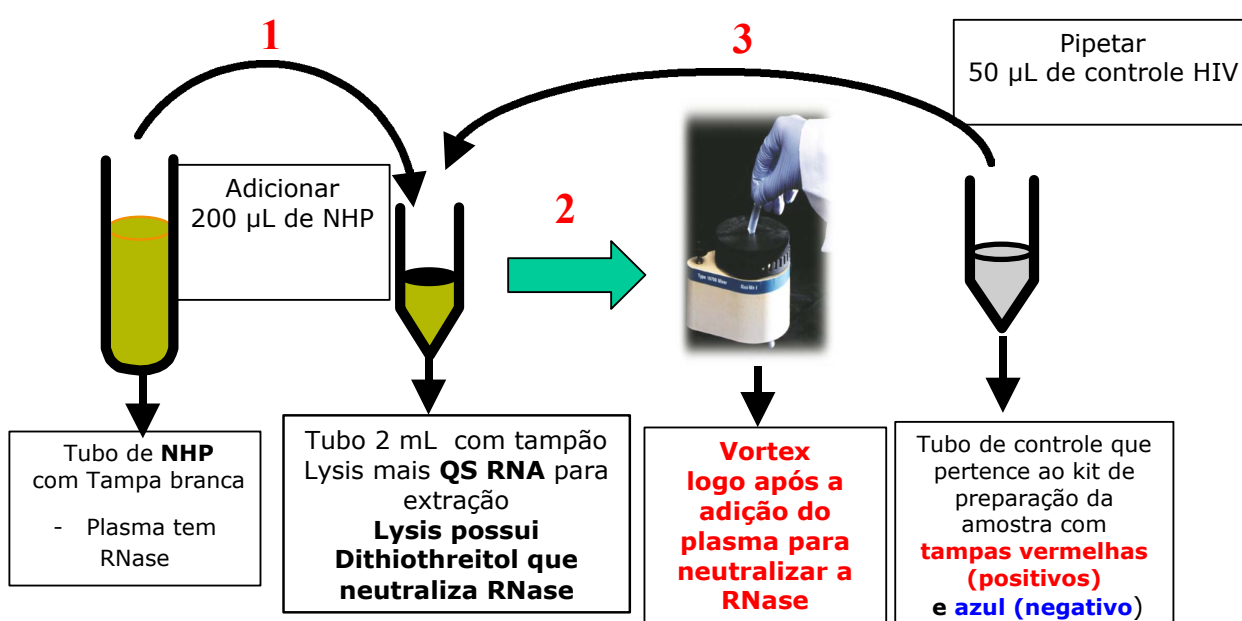
- Retirar o A-ring do saco plástico, não desprezar o saco plástico.
- Posicionar o A-ring no suporte do A-ring.
- Homogeneizar o **HIV-1 Mn<sup>2+</sup>, v1.5** (vortex).
- Adicionar **100 µL** (P200) de **HIV-1 Mn<sup>2+</sup>, v1.5** no frasco de **HIV-1 HIM MMX v1.5** tampar o frasco e agitar 10 a 15 vezes por inversão (estabilidade 4 horas 2-8°C). **Não** agitar o **Master Mix** no vortex. Descartar o frasco **HIV-1 Mn<sup>2+</sup>** restante.
- Distribuir **50 µL** (P200) de **Master Mix** pronto para o uso em cada tubo A-tube. (**não** fechar os **A-tubes** neste momento). Descartar o tubo **Master Mix** pronto para uso que sobrou.
- Retornar o A-ring com Master Mix ao saco plástico do A-ring e deixar à **2-8°C** e até o momento de usar O **Master Mix** pronto para uso é estável nos **A-tubes** .

## B) Preparação das amostras e controles

- Descongelar as amostras à temperatura ambiente, agitá-las (vortex) **3 a 5 seg.**
- Realizar um "spin" rápido das amostras para retirar o plasma da tampa e evitar contaminação de amostra para amostra. Abrir cada tubo usando uma gaze ou papel absorvente, trocar gaze ou papel para cada amostra. Ter o cuidado de não sujar as luvas quando manipular as amostras, evitando contaminar de uma amostra para outra.
- Deixar todos **reagentes** à temperatura ambiente.
- Identificar os tubos de **2,0 mL** com tampa de rosca com fundo em **V** para cada amostra e os 3 controles (negativo, positivo baixo, positivo alto), Marcar a face externa dos tubos em relação à parte externa da centrífuga para identificar a localização do "pellet".
- O frasco de reagente **HIV-1 LYS** deve ser colocado contra um fundo branco para verificar se há uma tonalidade amarela ou vazamento no frasco, caso isso ocorra contatar a Roche para reposição do kit inteiro, não utilizar o kit.
- Dissolver completamente os cristais do **HIV-1 LYS à 37°C (não usar BM)**, por no máximo **30** minutos (1 frasco é suficiente para **12** amostras).
- Homogeneizar o **HIV-1 QS v1.5** (tubo com tampa **roxa**) no vortex por **10 seg.**
- Adicionar **100 µL** (P200) do **HIV-1 QS, v1.5** em um frasco de **HIV-1 LYS, v1.5** observando a coloração rosa. Agitar bem no vortex, estável por 4 horas temperatura ambiente.
- Nesta etapa **todos os tubos deverão** estar **fechados** somente o tubo que está sendo manipulado deverá estar aberto e poderá ser usada uma única ponteira.
- Pipetar **600 µL** (P1000) do **Working Lysis Reagent** preparado na etapa anterior em cada tubo de 2.0 mL devidamente identificados, para **paciente e controles.**
- Adicionar **200 µL** (P200) **plasma** de **cada paciente** (vortex - 3 a 5 seg logo em seguida da adição).
- Nos tubos dos controles negativo e positivos (baixo e alto), adicionar **200 µL** (P200) **de NHP** (vortex - 3 a 5 seg logo após a adição).

- Agitar os tubos controles que vem no kit, fazer um spin para retirar o liquido da tampa e a seguir adicionar **50 µL dos controles** que estão no kit de extração com tampas **azul** e **vermelhas**. Ver esquema a seguir.

## SEQÜÊNCIA DE PREPARO DOS CONTROLES



- Incubar todos os tubos por **10 minutos temperatura ambiente**.
- Adicionar **800 µL (P1000) de isopropanol em cada tubo, somente o tubo que estiver sendo manipulado deverá estar aberto os outros deverão permanecer fechados neste momento, retampar e** agitar vigorosamente no vortex - **3 a 5 seg.**
- Verificar se foi feita a marca na face externa dos tubos em relação à parte externa da centrífuga para identificar a localização do "pellet".
- Centrifugar a **16.000 g por 15 min** temperatura ambiente.
- Usando uma transfer tip para cada amostra aspirar lentamente o sobrenadante pela parede oposta da marcação do tubo e pelo menisco do líquido tomando cuidado para não raspar ou perder o "pellet" (**Não usar bomba de vácuo**). Poderá restar até **20µL**.

- Adicionar **1.0 mL** (P1000) **de etanol 70% preparado no momento do uso** (vortex 3 a 5 seg) temperatura ambiente, em frasco e pipetas estéreis. Neste momento o "pellet" é visível.

	<b>Etanol Absoluto Merck</b>	<b>Água Destilada</b>	<b>Etanol 95% Merck</b>	<b>Água Destilada</b>
12 amostras	10,5 mL	4,5	11,0 mL	4,0 mL
24 amostras	21 mL	9,0	22,0 mL	8,0 mL

- Centrifugar **16.000 g por 5 min** temperatura ambiente.
- Usando uma transfer tip para cada amostra aspirar lentamente o sobrenadante pela parede oposta da marcação do tubo e pelo menisco do líquido tomando cuidado para não raspar ou perder o "pellet" (**Não usar bomba de vácuo**), retirar o máximo possível, a presença do álcool pode inibir a reação da PCR parcial ou totalmente.
- Adicionar **400 µL** (P1000) **HIV-1 DIL** (vortex - 10 seg).
- A amplificação das amostras e controles deverá ser realizada dentro de 2 horas, caso não seja possível, congelar imediatamente a -20°C por no máximo uma semana, as amostras extraídas somente poderão ser descongeladas uma vez, mais de um descongelamento poderá abaixar a carga viral.
- Caso as amostras tenham sido congeladas, deixá-las à temperatura ambiente para descongelar. Agitar no vortex por 5 seg.
- Usando uma ponteira com filtro para cada amostra. Pipetar **50 µL** (P200) das amostras preparadas nos A-tubes, evitar pegar qualquer precipitado e **NÃO** passar com a ponteira, contendo amostra, por cima de outros tubos que estão abertos, tampar imediatamente após a adição da amostra. Uma vez colocada a amostra preparada no A-tube com Master Mix a amplificação deverá ser iniciada dentro de 45 minutos.
- Levar o(s) A-ring(s) ao termociclador do Cobas Amplicor.

**C) Preparação do COBAS AMPLICOR (Área 2 – Amplificação e Detecção)**

**a) Ligar a IMPRESSORA.**

**b) Realizar a Manutenção Diária.**

➤ **Wash Buffer Kit**

Preparar Wash Buffer **concentrado 10 vezes** (2 garrafas)

Diluir o Wash Buffer com água destilada - **Estável por 2 semanas a temperatura ambiente.**

- Armazenar de 2-25°C.
- 500 testes por kit

1. Encher o **RESERVATÓRIO** (galão branco) do **tampão de lavagem**, diluindo o **Wash Buffer** seguindo tabela abaixo:

<b>Wash 10X concentrado</b>	<b>Água Destilada</b>	<b>Volume Total</b>
200 mL	1,8 L	2 L
400 mL	3,6 L	4 L
500 mL	4,5 L	5 L
600 mL	5,4 L	6 L
800 mL	7,2 L	8 L
1000 mL	9,0 L	10 L

2. Esvaziar o **ESGOTO** (galão amarelo).
3. Limpar a **TORRE** de inicialização com uma gaze umedecida com água.
4. Limpar o **PEGADOR** de D-cup com uma gaze umedecida com água, tomando o cuidado de não enroscar a gaze na molinha
5. Realizar um **EXTENDED Prime**.
  - Aparelho desligado
  - Abrir o **TCB**
  - Ligar o aparelho
  - Pressionar **SYSTEM** até aparecer **DEVICE CHECK**
  - Pressionar **2**
  - Pressionar **1 PRIME**
  - Pressionar **STEP (EXTENDED PRIME)**
  - Pressionar **ESCAPE**
  - Fechar **TCB**
6. Durante prime verifique **SERINGAS, TUBULAÇÃO, BLOCO CE VÁLVULAS**.
7. Verificar **TRANSFER TIP** (agulha).
8. Verificar se a **IMPRESSORA** está ligada

### c) Preparo dos reagentes

Verificar a quantidade necessária para os testes a serem realizados, procedendo da seguinte maneira:

- Pressionar **LOAD** até aparecer na tela L-Rcass.
- Pressionar **NEXT** até aparecer a rack desejada.
- Pressionar **PRINT** para obter uma cópia da quantidade da reagentes de cada rack.



### c1) Preparar Reagentes Específicos

➤ **IM Probe Suspension** (1 cassete = 100 testes)

- Agitar bem **IM PS1** no vortex.
- Misturar bem no vortex **IM PS1**, transferir **2,5 mL** da **IM PS1** para um cassete de reagente contendo **IM4, v1.5 NÃO INVERTER, NÃO AGITAR.**

Uma vez preparado, o reagente é **estável por 14 dias a 2-8°C**. O reagente pode ser usado por no máximo 2 ciclos (24 horas por ciclo) no instrumento e deve ser armazenado de 2-8°C entre os ciclos.

➤ **IQ Probe Suspension** (1 cassete = 100 testes).

- Agitar bem **IQ PS1** no vortex
- Transferir **2,5 mL** da **IQ PS1, v 1.5** para o cassete de reagente contendo **IQ4,v1.5 NÃO INVERTER, NÃO AGITAR.**

Uma vez preparado, o reagente é **estável por 30 dias a 2-8°C**. O reagente **IQ4** pode ser usado por no máximo 4 ciclos (24 horas por ciclo) no instrumento e deve ser armazenado de 2-8°C entre ciclos.

➤ **AD3 Diluente do Amplicon** (1 cassete 75 testes) Pronto para uso

Uma vez colocado no Cobas Amplicor, este reagente é **estável por 30 dias** de 2-8°C ou até a data de validade. Este reagente pode ser usado por no máximo 4 ciclos (24 horas por ciclo) no instrumento e deve ser armazenado de 2-8°C entre os ciclos

## c2) Preparar Reagentes Genéricos

### ➤ **Solução de Desnaturação** (1 cassete 100 testes) - **Pronta para uso**

Uma vez colocado no Cobas Amplicor, este reagente é **estável por 30 dias** de 2-8°C ou até a data de validade. Este reagente pode ser usado por no máximo 4 ciclos (24 horas por ciclo) no instrumento e deve ser armazenado de 2-8°C entre os ciclos

### ➤ **Avidin-HRP Conjugate** (1 cassete) - **Pronto para uso**

Uma vez colocado no Cobas Amplicor, este reagente é **estável por 30 dias** de 2-8°C ou até a data de validade. Este reagente pode ser usado por no máximo 4 ciclos (12 horas por ciclo) no instrumento e deve ser armazenado de 2-8°C entre os ciclos.

### ➤ **Substrate SB3 - Substrate SB** (5 frascos) (1 cassete = 75 testes)

Pipetar **5 mL** do **SB** no cassete contendo **SB3**. Para homogeneização, utilize a pipeta, aspirando e soltando a mistura 5 vezes.

O substrato de trabalho deve ser preparado todo dia.

O substrato pronto é **estável por 16 horas**. Não expor SB3 e SB ou substrato preparado para uso, a metais agentes oxidantes ou luz direta.

## D) LOAD Cassetes de Reagentes na Rack

- Pressionar **LOAD** até aparecer **L-Rcass**.
- Pressionar **EDIT**.
- Digitar o número da rack ou usar o leitor de código de barras.
- Pressionar **ENTER**.
- Colocar a **posição do cassete** na rack com o **leitor de código de barras** ou **teclado**. Se usar o **teclado** pressionar **ENTER**.
- Colocar o número de **identificação do cassete** como o **leitor de código de**
- **barras** ou **teclado**. Se usar o **teclado** pressionar **ENTER** .
- Repetir as duas últimas etapas para cada cassete adicionado na rack.
- Pressionar **ESCAPE** para salvar
- Posicionar bem os cassetes na rack


## E) LOAD Racks de Reagentes na Plataforma

- Pressionar **LOAD** até aparecer **L-Rack**
- Pressionar **EDIT**.
- Colocar o número de identificação da rack com o leitor de código de barras ou teclado. Se usar o teclado pressionar **ENTER**.
- Com o leitor de código de barras escolher a posição que a rack será colocada . Loc **1** **Loc 2** ou generic.
- Pressionar **ENTER**.
- Pressionar **Escape** para salvar.

## F) LOAD A-rings

- Colocar o A-ring na posição desejada (TCA, TCB, DP1, DP2)
- Pressionar **LOAD** até aparecer **L-Aring**
- Pressionar **EDIT**
- Pressionar **ENTER** para selecionar a posição **LOAD** apropriada
- Colocar o número de identificação com o leitor de código de barras ou teclado. Se usar o teclado pressionar **ENTER**
- Pressionar **ESCAPE** para salvar

## G) Fazer uma ordem (lista de trabalho) para o A-rings (Worklist com perfil)

- Pressionar **ORDER** até aparecer **O-Entry**
- Pressionar **EDIT**
- Colocar o número do **A-ring** com o **leitor de código de barras ou teclado**
- Pressionar **ENTER**
- A mensagem **NEW ORDER** aparecerá na tela
- Pressionar **ENTER**
- Colocar o **número do perfil**
- Pressionar **ENTER**
- Opcional - Colocar o **número da amostra** para o primeiro **A-tube**
- Pressionar **ENTER**
- Pressionar  para passar para a próxima amostra
- Repetir o processo para cada **A-tube**
- Pressionar **PRINT** para obter uma cópia
- Pressionar **ESCAPE** para salvar

**F) Selecionar o Modo de corrida**

- Pressionar **SYSTEM** até aparecer **SY-Conf**
- Pressionar **1** para selecionar **SYSTEM SET UP**
- Pressionar **EDIT**
- Usar **STEP** para selecionar o modo de corrida **BASIC** ou **PARALLEL**
- **Basic** reação do começo ao fim sem intervenção do operador
- **Parallel** o aparelho pára após a desnaturação. O operador troca os A-rings para a posição de detecção e acrescenta outro A-ring para amplificar
- Pressionar **ENTER**
- Pressionar **ESCAPE** para salvar

**I) LOAD D-Cups** (posicionar bem as racks)

**J)** Verificar se o **WASTE** foi esvaziado.

**K)** Verificar se o **RESERVOIR** foi abastecido com solução de lavagem

**L)** Verificar se a **IMPRESSORA** foi ligada.

**M)** Pressionar **START**

**N)** Verificar **LOAD Check** que a impressora imprimiu

**O)** Verificar **RESULTS**

### Para deletar resultados

**OBS:** Recomenda-se deletar os resultados regularmente ou quando atingir 500 testes.


















1. Pressionar **RESULT** até aparecer na tela R-Treat
2. Pressionar **2** Result Management.
3. Usar **STEP** para selecionar Delete ID (um A-ring específico) ou Delete All A-rings para apagar todos resultados.
4. Pressionar **SHIFT** e **ENTER** simultaneamente para confirmar a seleção

### Para ver resultados

1. Pressionar **RESULT** até aparecer na tela R-Treat
2. Pressionar **1** para selecionar Result Inspection
3. Pressionar **EDIT**
4. Digitar o número do A-ring, pressionar **ENTER**
5. **□** para ver o resultado de cada A-tube.
6. Pressionar **ESCAPE** quando terminar.

## 5. Procedimentos para operação dos equipamentos

### Cobas Amplicor Guia Rápido de Referência

TECLA	FUNÇÃO DA TECLA	TECLA	FUNÇÃO DA TECLA
	Ver o andamento da corrida.		Mover para o campo ou linha anterior
	Carregar amostras, reagentes e racks.		Inserir letras ou símbolos.
	Identificar A-ring, amostras. Selecionar controle ou amostra. Determinar os testes ou perfil a ser realizado.		Selecionar a escolha dentro de um campo particular.
	Ver e imprimir resultados e apagar arquivos.		Selecionar o próximo arquivo.
	Selecionar o modo básico ou paralelo. Inserir os parâmetros no sistema. Mudar data e hora. Prime o sistema.		Mover para o próximo campo ou linha.
	Pressionar para iniciar uma corrida.		Inserir informação numérica ou código numérico para letras.
	Interromper ou abortar uma corrida.		Deletar só um carácter.
	Sair de qualquer tela salvando os dados inseridos. Para voltar para a primeira tela principal.		Permitir ao operador fazer mudanças, selecionar opções e dados.
	Mostrar informação sobre o campo selecionado.		Imprimir a lista corrente ou o arquivo que se apresenta na tela.
	Usada em conjunto com outras teclas para mover em direção contrária.		Salvar os dados inseridos e mover para o próximo arquivo.

## Teclas que são utilizadas simultaneamente

<b>SHIFT</b> & <b>ZERO</b>	Para deletar o campo onde está o cursor.
<b>SHIFT</b> & <b>←PACE</b>	Para deletar um arquivo inteiro (Ex: Rack de Reagentes, Ordem, Perfil, Test File, PCR File).
<b>SHIFT</b> & <b>ENTER</b>	Para confirmar uma ação (Ex: apagar resultados, alterar data e hora). Mover o cursor um espaço para trás.
<b>SHIFT</b> & <b>NEXT</b>	Para mover o cursor para arquivos anteriores.
<b>SHIFT</b> & <b>STEP</b>	Para mover o cursor para opções anteriores.
<b>SHIFT</b> & <b>ALPHA</b>	Teclas utilizadas na tela alfa-numérica, para mover o cursor para telas anteriores.



## Tabela Alfa-numérica

<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>	<b>J</b>	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>M</b>
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
<b>N</b>	<b>O</b>	<b>P</b>	<b>Q</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>T</b>	<b>U</b>	<b>V</b>	<b>W</b>	<b>X</b>	<b>Y</b>	<b>Z</b>
23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>	<b>e</b>	<b>f</b>	<b>g</b>	<b>h</b>	<b>i</b>	<b>j</b>	<b>k</b>	<b>l</b>	<b>m</b>
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
<b>n</b>	<b>o</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>r</b>	<b>s</b>	<b>t</b>	<b>u</b>	<b>v</b>	<b>w</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
<b>*</b>	<b>!</b>	<b>#</b>	<b>\$</b>							<b>-</b>	<b>/</b>	<b>=</b>
36	37	38	39						66	67	68	69

O 66 é usado como espaço

STATUS	LOAD	ORDER	RESULT	SYSTEM
<b>RUN</b> (S-Run)	<b>A-RINGS</b> (L-ARing)	<b>ORDER ENTRY</b> (A-ring Worklist) (O-Entry)	<b>TREATMENT</b> (R-Treat) <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Result Inspection</li> <li>2. Result Management</li> <li>3 .Result Calibration</li> </ol>	<b>Programming (SYProg)</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Test File</li> <li>2. PCR File</li> </ol>
<b>LOAD</b> (S-Load)	<b>REAGENT RACKS</b> (L-RRack)	Create <b>PROFILES</b> (O.Profi)		<b>Configuration</b> (SY-Conf) <ol style="list-style-type: none"> <li>1.System Setup</li> <li>2.Result Setup</li> <li>3.Printout Setup</li> <li>4.Operators Access</li> <li>5.Interface Configuration</li> <li>6.Version Information</li> </ol>
<b>LOADCHECK</b> S-LoaCh	<b>REAGENT CASSETTES</b> (LRCass)			
<b>OPERATOR</b> (S-Oper)				
<b>TIME/DATE</b> (S-Time)				<b>DIAGNOSTIC</b> (SY-Diag) <ol style="list-style-type: none"> <li>1.Key &amp; Barcode Check</li> <li>2.Device Check                             <ol style="list-style-type: none"> <li>1.Prime</li> <li>2.Wash Arm Adjust</li> <li>3.Syringe Exchange</li> <li>4.Host Interface Check</li> <li>5.Print Interf. Check</li> <li>6.Photometer Check</li> <li>7.RAM Check</li> <li>8.Run In</li> </ol> </li> <li>3.Instrument Run Info</li> <li>4.Files Summary</li> <li>5.Message Log</li> </ol>
				<b>ADVANCED DIAGNOSTIC (SY-Adia)</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.Remote Diaqnostic</li> </ol>

## PREPARAR UMA CORRIDA NO SISTEMA COBAS AMPLICOR

1. Pré-PCR – Preparação do Reagente
2. Pré-PCR – Preparação das Amostras e Controles
3. Pós-PCR – Amplificação e Detecção
  - a. Realizar a manutenção diária
  - b. Preparar reagentes
  - c. Carregar os cassetes de reagentes na rack
  - d. Carregar as racks de reagentes na plataforma
  - e. Carregar A-rings
  - f. Fazer a lista de trabalho para os A-rings
  - g. Selecionar o modo de corrida
  - h. Carregar D-cups
  - i. Pressionar **START**
  - j. Verificar a impressão do Load Check
  - k. Verificar os resultados

### A. Manutenção Diária

1. Limpar o poste de inicialização
2. Limpar o pegador de D-cup
3. Encher o reservatório do tampão de lavagem
4. Esvaziar o esgoto
5. Prime o instrumento
  - Pressionar **SYSTEM** até aparecer na tela SY-Dyag
  - Pressionar **<2>** Device Check
  - Pressionar **<1>** Prime
  - Pressionar **START** para iniciar prime
  - Quando completar Prime pressionar **ESCAPE**

6. Extended Prime
  - Desligar o equipamento
  - Abrir o **TCB**
  - Ligar o equipamento
  - Pressionar **SYSTEM** até aparecer na tela SY-Diag
  - Pressionar **2** para selecionar Device Check
  - Pressionar **1** para selecionar Prime
  - Pressionar **STEP** (Extended prime)
  - Pressionar **ESCAPE**.
  - Fechar **TCB** para iniciar o prime
  - O prime parará automaticamente
7. Durante prime verifique seringas, tubulação, bloco de válvula, presença de vazamento.
8. Verificar Transfer tip ("agulha") quanto a presença de gota
9. Verificar se impressora está ligada

## B. Preparo de Reagentes

1. Pressionar **LOAD** até aparecer na tela L-Rcass.
2. Pressionar **NEXT** até aparecer a rack desejada.
3. Pressionar **PRINT** para obter uma cópia da quantidade de reagentes de cada rack
4. Preparar a quantidade necessária para os testes a serem realizados

## COBAS AMPLICOR – Reagentes Específicos

- **#Probe Suspension** (1 cassete = 100 testes).
  - Agitar bem **# PS1** no vortex
  - Transferir **2,5 mL** da **# PS1** para o cassete de reagente contendo **#PS NÃO INVERTER, NÃO AGITAR.**Verificar na bula a validade depois de preparado o reagente
- **AD3 Diluente do Amplicon** (1 cassete 75 testes) Pronto para uso

Uma vez colocado no Cobas Amplicor, este reagente é **estável por 30 dias** de 2-8°C ou até a data de validade. Este reagente pode ser usado por no máximo 4 ciclos (24 horas por ciclo) no instrumento e deve ser armazenado de 2-8°C entre os ciclos

## COBAS AMPLICOR – Reagentes Genéricos

### COBAS AMPLICOR Generic Detection kit (100 testes)

- **Solução de Desnaturação** (1 cassete = 100 testes) Pronto para uso.  
Uma vez colocado no CA, esse reagente é estável por 30 dias ou até a data de validade do kit. Este reagente pode ser usado no máximo 6 ciclos (12 horas cada) no instrumento e deve ser armazenado 2-8°C entre as corridas.
- **Avidin-HRP Conjugate** (1 cassete 100 testes qualitativos ou 16 determinações quantitativas). Pronto para uso.  
Uma vez colocado no CA, este reagente é estável por 30 dias ou até a data de validade do kit. Este reagente pode ser usado no máximo 6 ciclos (12 horas cada) no instrumento e deve ser armazenado 2-8°C entre as corridas.
- **Substrate A (5 cassetes) – Substrate B** (5 frascos)  
(75 testes qualitativos ou 12 determinações no quantitativo)  
Pipetar 5 mL do Substrate B (SB) no cassete contendo Substrate (SB3) e aspirar/pipetar 5 vezes com a pipeta, para homogeneização.  
O substrato de trabalho deverá ser preparado todo dia. O substrato pronto é estável por 16 horas.
- **Wash Buffer kit** - Wash Buffer concentrado 10 vezes (2 garrafas) - 500 testes.  
Diluir o Wash Buffer com água destilada – Estável por 2 semanas a temperatura ambiente . Armazenar de 2-25°C.

### C) LOAD Cassetes de Reagentes na Rack

1. Pressionar **LOAD** até aparecer L-Rcass.
2. Pressionar **EDIT**.
3. Digitar o número da rack ou use o leitor de código de barras Pressionar **ENTER**.
4. Se for uma nova rack, a mensagem New File aparecerá. Pressionar **ENTER**.
5. Pressionar **STEP** para selecionar o tipo de rack. Pressionar **ENTER**.
6. Colocar a posição do cassete na rack com o leitor de código de barras ou teclado .Se usar o teclado pressionar **ENTER**.
7. Colocar o número de identificação do cassete com o leitor de código de barras ou teclado. Se usar o teclado pressionar **ENTER**.
8. Repetir as etapas 6 e 7 para cada cassete adicionado na rack.

9. Pressionar **PRINT** para obter uma cópia.
10. Pressionar **ESCAPE** para salvar

#### **D) LOAD racks de reagentes na plataforma**

1. Pressionar **LOAD** até aparecer na tela L-Rrack.
2. Pressionar **EDIT**.
3. **ENTER** para mover o cursor para a posição apropriada da rack (loc1, loc2 ou genérico).
4. Colocar o número da rack para cada posição usando o leitor de código de barras ou o teclado. Pressionar **ENTER**
5. Pressionar **ESCAPE** para salvar.


#### **Para apagar:**

1. Um campo - pressionar SHIFT e Zero simultaneamente.
2. Uma rack inteira de reagentes - pressionar SHIFT e **Space** simultaneamente

#### **E) LOAD A-rings**

1. Colocar o **A-Ring** na posição desejada (**TCA, TCB, DP1, DP2**)
2. Pressionar **LOAD** até aparecer na tela **L-Aring**.
3. Pressionar **EDIT**.
4. Pressionar **ENTER** para selecionar a posição apropriada
5. Colocar o número de identificação com o leitor de código de barras ou teclado se usar o teclado pressionar **ENTER**.
6. Pressionar **PRINT** para obter uma cópia.
7. Pressionar **ESCAPE** para salvar

**F) Fazer uma ordem de trabalho para o A-Ring (com perfil)**

1. Pressionar **ORDER** até aparecer na tela **O-Entry**.
2. Pressionar **EDIT**.
3. Colocar o número do **A-Ring** com o leitor de código de barras ou teclado. Pressionar **ENTER**.
4. A mensagem **NEW ORDER** aparecerá na tela. Pressionar **ENTER**.
5. Colocar o número do perfil. Pressionar **ENTER**.
6. Colocar o número da amostra para o primeiro A-Tube-(opcional). Pressionar **ENTER**.
7. Pressionar  para passar para a próxima amostra.
8. Repetir as etapas 6-7 para cada A-Tube.
9. Se o teste é quantitativo, aceitar ou entrar o número de cópias por reação de PCR (QS#), Intervalo do controle positivo baixo (LPCLo, LPC HI) e o intervalo do controle positivo alto (HPCLo, HPCHI). Esses dados são encontrados no cartão que acompanha o kit .
10. Pressionar **PRINT** para obter uma cópia
11. Pressionar **ESCAPE** para salvar

**F1) Fazer uma ordem de trabalho para o A-Ring**

Lista de trabalho **sem** perfil para teste **quantitativo**

1. Pressionar **ORDER** até aparecer na tela **O-Entry**.
2. Pressionar **EDIT**.
3. Colocar o número do **A-Ring** com o leitor de código de barras ou teclado. Pressionar **ENTER**.
4. A mensagem **NEW ORDER** aparecerá na tela. Pressionar **ENTER**.
5. Não colocar o número do perfil. Pressionar **ENTER**.

6. Identificar a amostra no primeiro A-tube (opcional). Pressionar **ENTER**.
7. Pressionar **STEP** para selecionar o tipo de amostra: (C) Controle (S) Amostra. Pressionar **ENTER**
8. Se (C) for selecionado escolha uma das seguintes opções:
  - Para controle (-), pressionar **STEP** para aparecer (-). Pressionar **ENTER**. Pressionar **STEP** para selecionar o teste. Pressionar **ENTER**.
  - Para controle(+) baixo, pressionar **STEP** para aparecer (+). Pressionar **ENTER**. Pressionar **STEP** para selecionar o teste. Pressionar **ENTER**.
  - Para controle (#) alto, pressionar **STEP** para aparecer (#). Pressionar **ENTER**. Pressionar **STEP** para selecionar o teste. Pressionar **ENTER**.
9. Se (S) for selecionado, deixar o campo de opção do teste vazio, pressionar **ENTER**. Pressionar **STEP** para selecionar o teste. Pressionar **ENTER**. Se um segundo teste for desejado, pressionar **STEP** para selecionar o teste. Pressionar **ENTER**.
10. Pressionar **▶** para ir para a próxima amostra.
11. Repetir o processo para cada A-tube
12. Pressionar **▶** até aparecer QS copy (QS#)
13. Aceitar ou entrar o número de cópias por reação de PCR (QS#) Intervalo do controle positivo baixo (LPCLo, LPC HI) e o intervalo do controle positivo alto (HPCLo, HPCHi). Esses dados são encontrados no cartão que acompanha o kit .Usar o leitor de código de barras ou o teclado.
14. Pressionar **PRINT** para obter uma cópia.
15. Pressionar **ESCAPE** para salvar a lista de trabalho do A-ring.




**F2) Fazer uma ordem de trabalho para o A-Ring**Lista de trabalho **sem** perfil para teste **qualitativo**

1. Pressionar **ORDER** até aparecer na tela **O-Entry**.
2. Pressionar **EDIT**.
3. Colocar o número do **A-Ring** com o leitor de código de barras ou teclado. Pressionar **ENTER**.
4. A mensagem **NEW ORDER** aparecerá na tela. Pressionar **ENTER**.
5. Não colocar o número do perfil. Pressionar **ENTER**.
6. Identificar a amostra no primeiro A-tube (opcional). Pressionar **ENTER**.
7. Pressionar **STEP** para selecionar o tipo de amostra: (C) Controle (S) Amostra. Pressionar **ENTER**.
8. Se (C) for selecionado escolha uma das seguintes opções:
  - Para controle (-), pressionar **STEP** para aparecer (-). Pressionar **ENTER**. Pressionar **STEP** para selecionar o teste. Pressionar **ENTER**.
  - Para controle(+) pressionar **STEP** para aparecer (+). Pressionar **ENTER**. Pressionar **STEP** para selecionar o teste. Pressionar **ENTER**.
9. Se (S) for selecionado, Reflex testing é opcional:
  - Para usar a opção relex testing: Pressionar **STEP** para selecionar (\*) pressionar **ENTER**, depois **STEP** para selecionar o teste primário . Pressionar **ENTER**. Pressionar **STEP** para selecionar (+) ou (-) Pressionar **ENTER** e depois **STEP** para selecionar o Reflex test.

(\*) Determina que o teste selecionado é o teste primário  
(+) Determina que se teste primário for **positivo** o REFLEX test selecionado será realizado automaticamente.  
(-) Determina que se teste primário for **negativo** o REFLEX test selecionado será realizado automaticamente.

- Se a opção Reflex testing não é desejada deixar o campo de opção do teste em branco e pressionar **ENTER**. Pressionar **STEP** para selecionar o teste. Pressionar **ENTER** duas vezes .

10. Pressionar  para ir para o próximo A-tube.
11. Repetir a partir da etapa 6 para cada A-tube.
12. Pressionar **PRINT** para obter uma cópia.
13. Pressionar **ESCAPE** para salvar a lista de trabalho para o A-ring.

### G) Selecionar o Modo de corrida

1. Pressionar **SYSTEM** até aparecer na tela **SY- Conf**
2. Pressionar **1** para selecionar SYSTEM SET UP
3. Pressionar **EDIT**
4. Usar **STEP** para selecionar o módulo de corrida **BASIC (-)** ou **PARALLEL(=)**
5. Basic - reação do começo ao fim sem intervenção do operador
6. Parallel - o aparelho pára após a Desnaturação , o operador troca os A-Rings para a posição de detecção e acrescenta outro A-Ring para amplificar
7. Pressionar **ENTER**
8. Pressionar **ESCAPE** para salvar

## H) Iniciar uma corrida

1. Verificar a quantidade de D-cup
2. Verificar se o reservatório de solução de lavagem é suficiente para realizar a corrida
3. Esvaziar o waste container (galão esgoto)
4. Pressionar **START**
5. Verificar a impressão do **LOAD CHECK**

## I) Gerenciar Resultados

### Para deletar resultados

**OBS:** Recomenda-se deletar os resultados semanalmente.

5. Pressionar **RESULT** até aparecer na tela R-Treat
6. Pressionar **2** Result Management.
7. Usar **STEP** para selecionar delete ID (um A-ring específico) ou Delete All A-rings
8. Pressionar **SHIFT** e **ENTER** simultaneamente para confirmar a seleção

### Para ver resultados

7. Pressionar **RESULT** até aparecer na tela R-Treat
8. Pressionar **1** para selecionar Result Inspection
9. Pressionar **EDIT.**
10. Digitar o número do A-ring, pressionar **ENTER**
11. **□** para ver o resultado de cada A-tube.
12. Pressionar **ESCAPE** quando terminar.

## START

Pressionar **START**. O analisador realizará um Load Check, verificando os seguintes itens:

- Volumes e cassetes de reagentes
- Volume do tampão de lavagem no reservatório
- Volume do galão de esgoto
- Número do A-ring e a correspondência com o número das ordens
- Número do D-cups
- Blank do substrato

## STOP

Pressionar **STOP**, depois usar **STEP** para selecionar as seguintes opções. Pressionar **SHIFT** e **ENTER** simultaneamente quando aparecer a escolha desejada na tela.

### Stop Transfer

Durante o Load Check - o mecanismo de transferência termina a tarefa e depois para. Testes não são perdidos e a operação do Termociclador não será afetada

Durante a corrida- Novas amostras não serão realizadas, a atividade do mecanismo de transferência continua até terminar os testes que foram iniciados. A operação do termociclador não será afetada.

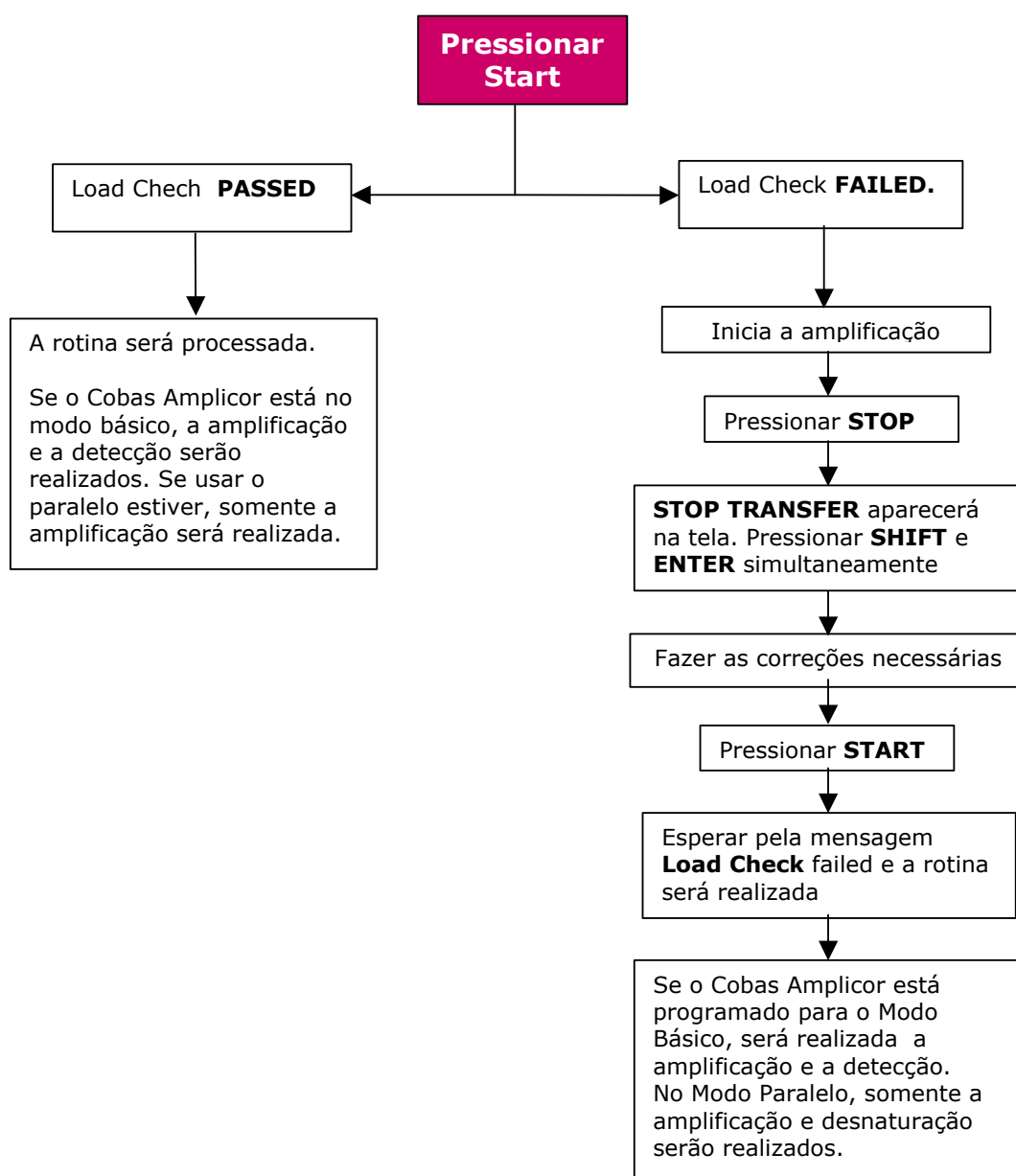
### Abort Transfer

Imediatamente para o mecanismo de transferência. Todos os testes em processo são perdidos. A operação do termociclador não será afetada.

**Abort TCA**- A operação do TCA será abortada

**Abort TCB**- A operação do TCB será abortada.

## FLUXO DO LOAD CHECK



**Nomenclatura dos cassetes dos testes qualitativos e PCR File e Teste File**

<b>Nome do teste</b>	<b>PCR File</b>	<b>Teste File</b>	<b>Rótulo do Cassete</b>
Chlamydia trachomatis	STD	CT	CT4
Neisseria gonorrhoeae	STD	NG	NG4
Controle Interno CT e NG	STD	CNC	IC4
Hepatite C qualitativo	HCV	HCV	HC4
Controle interno HCV	HCV	HCC	IC4
Hepatite C qualitativo (v2.0)	HCX	HCX	CX4
Controle Interno da Hepatite C (v2.0)	HCX	HXC	IC4
Mycobacterium avium	MYC	MAV	MA4
Mycobacterium intracellulare	MYC	MIN	MI4
Mycobacterium tuberculosis	MYC	MTB	MT4
Mycobacterium	MYC	MYC	MY4
Controle Interno Mycobacterium	MYC	MCC	IC4

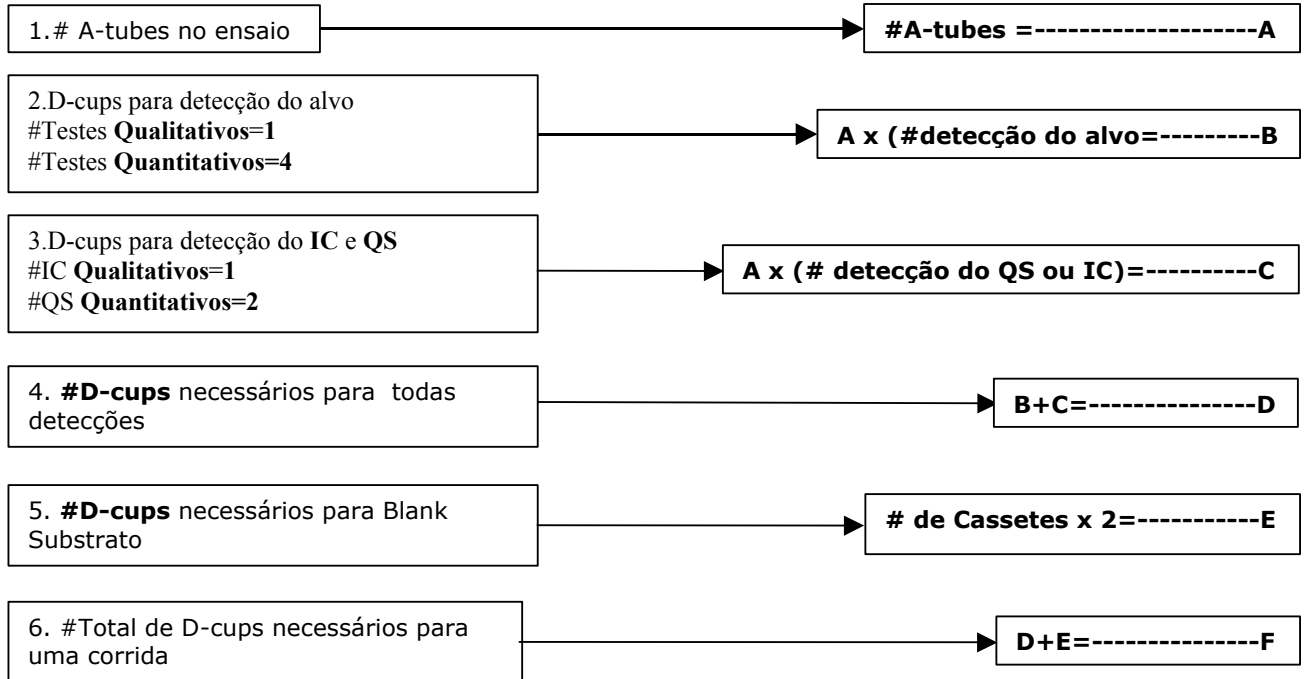
Nota: Alguns testes Cobas Amplicor e Cobas Amplicor Monitor podem não ter sido aprovados para uso em todos países. Consulte um representante da Roche para os testes que estão disponíveis no seu país.

**Nomenclatura dos cassetes dos testes quantitativos e PCR File e Teste File**

<b>Nome do teste</b>	<b>PCR File</b>	<b>Teste File</b>	<b>Rótulo do cassete Probe Suspension 2</b>	<b>Rótulo do cassete Probe Suspension 2 Padrão de Quantificação QS</b>
Cytomegalovirus Monitor™	CMM	CMM	VM4	VQ4
Hepatite B Monitor™	HBM	HBM	BM4	BQ4
Hepatite C Monitor™	HCM	HCM	CM4	CQ4
HIV Monitor™	HIM	HIM	IM4	IQ4
HIV Monitor Ultrasensível™	HIS	HIS	IM4	IQ4

Tabela 1- Consumo de D-cups

### Cálculo do Consumo de D-cup



Legenda:  
# = número



## Cálculo de Consumo de Reagentes

**Tabela 2 :Consumo de Reagente**

Nome do Reagente	Número de testes por cassete	Total do número de testes por corrida ( <b>X</b> )	Número de testes que restam no Sistema ( <b>Y</b> )	Número adicionais de testes necessários ( <b>X-Y</b> ) = <b>Z</b>	Número de cassetes necessários para adicionar (¶¶)
Denaturation Solution	<b>100</b>	<b>A =</b>	<b>Y =</b>	<b>Z =</b>	<b>Z/100 =</b>
Conjugate	<b>100</b>	<b>D =</b>	<b>Y =</b>	<b>Z =</b>	<b>Z/100 =</b>
Substrate	<b>75</b>	<b>F =</b>	<b>Y =</b>	<b>Z =</b>	<b>Z/100 =</b>
Target Probe Suspension	<b>100</b>	<b>B =</b>	<b>Y =</b>	<b>Z =</b>	<b>Z/100 =</b>
IC Probe Suspension**	<b>100</b>	<b>C =</b>	<b>Y =</b>	<b>Z =</b>	<b>Z/100 =</b>
QS Probe Suspension***	<b>100</b>	<b>C =</b>	<b>Y =</b>	<b>Z =</b>	<b>Z/100 =</b>
Amplicon Dilution Reagent***	<b>75</b>	<b>3XA =</b>	<b>Y =</b>	<b>Z =</b>	<b>Z/100 =</b>

\*\* Opcional para testes Qualitativos

\*\*\* Usado nos testes Quantitativos

¶¶ Se o número desta coluna for menor que 1, um cassete de reagente deve ser adicionado ao sistema

**COBAS AMPLICOR REAGENTES**

Nome do Reagente	Número de Testes	Instruções de Preparo	Armazenagem e Estabilidade
<b>Probe Suspension</b> (alvo específico) <b>Probe Suspension</b> (IC específico) (QS específico)	<b>100</b> testes qualitativos <b>24</b> determinações quantitativas  <b>100</b> testes qualitativos <b>48</b> determinações (QS)	1. Agitar no Vortex <b>Probe Suspension 1</b> . 2. Transferir <b>2,5 mL</b> da <b>Probe Suspension 1</b> no <b>cassete Probe suspension 2</b> . 3. Não agitar	Verificar na bula
<b>Substrate (SB)</b>	<b>75</b>	1. Pipetar <b>5 mL</b> do <b>Substrate B (SB)</b> no cassete contendo <b>Substrate (SB3)</b> 2. Homogeneizar com a pipeta aspirando e soltando várias vezes	O substrato preparado é estável por 16 horas. Preparar diariamente.
<b>Conjugate (CN)</b>	<b>100</b>	Pronto para uso	Reagente em uso é estável por 30 dias quando armazenado 2-8°C
<b>Denaturation (DN)</b>	<b>100</b>	Pronto para uso	Reagente em uso é estável por 30 dias quando armazenado 2-8°C
<b>Amplicon Dilution Reagent</b>	<b>24</b> determinações (incluindo Alvo e QS)	Pronto para uso	Reagente em uso é estável por 30 dias quando armazenado 2-8°C
<b>Wash Buffer</b>	10 L da solução de lavagem diluída 1:10 =250 testes	Diluir 1 parte do Wash Buffer 10 X concentrado para 9 partes de água destilada	O wash Buffer diluído é estável por 2 semanas a temperatura ambiente

Wash 10X concentrado	Água Destilada	Volume Total
200 mL	1,8 L	2 L
500 mL	4,5 L	5 L
600 mL	5,4 L	6 L
800 mL	7,2 L	8 L
1000 mL	9,0 L	10 L

## Programação da Centrífuga Heraeus

### Precooling to 4°C

Usar a função **PRETEMP** para pré esfriar ou pré aquecer o rotor vazio.

1. Ligar a centrífuga e fechar a tampa.
2. Selecionar [ **P** ] na tela Program
3. Selecionar a temperatura **4°C** usando a tecla set no painel de temperatura.
4. Pressionar a tecla start. O rotor atingirá a temperatura dentro de 20 minutos.

### Para programar:

1. Pressionar a tecla program. Selecionar **Program 1** (9 programas podem ser armazenados na memória).
2. Abrir a memória pressionando a tecla **lock**.
3. Selecionar os parâmetros desejados:
  - Digitar **16000 RPM** pressionando as teclas "set" e "speed" no painel de controle.
  - Digitar o tempo de corrida **15 minutos** pressionando as teclas "set" e "time" no painel de controle.
  - Digitar a temperatura **20°C** pressionando as teclas "set" e "temperatura" no painel de controle.
5. Depois de programar todos os valores, aguardar um pouco até todos os valores pré-selecionados aparecerem simultaneamente.
6. Pressionar novamente a tecla **memory lock**. Program number 1 está programado.
7. Repetir as etapas acima para os outros programas, selecionando os parâmetros desejados.

## 6. Manutenção, Limpeza e Desligamento do Sistema COBAS AMPLICOR

### Remoção e limpeza da plataforma dos reagentes específicos, plataforma de D-cups e bloco incubador

- Certificar-se que o interruptor de força esteja desligado e o cabo de força desconectado da tomada.
- Certificar-se de que a ponteira de transferência (agulha) esteja totalmente levantada antes de movimentar o mecanismo de transferência.
- Antes de remover as bandejas, posicionar o mecanismo de transferência manualmente, de modo que fique totalmente do lado esquerdo de seu curso. Segurar na parte superior do mecanismo de transferência e com cuidado empurrá-lo para a esquerda.
- Remover quaisquer *racks* de reagentes e de D-cups do sistema e limpá-las mergulhando-as em água com sabão. Enxágua-las e deixar secar ao ar livre.
- Retirar a plataforma vibratória da *rack* de reagente específico, soltando os dois parafusos e levantando a placa do sistema (Figura 1).
- Limpar a placa com um pano úmido e secar com um pano seco.

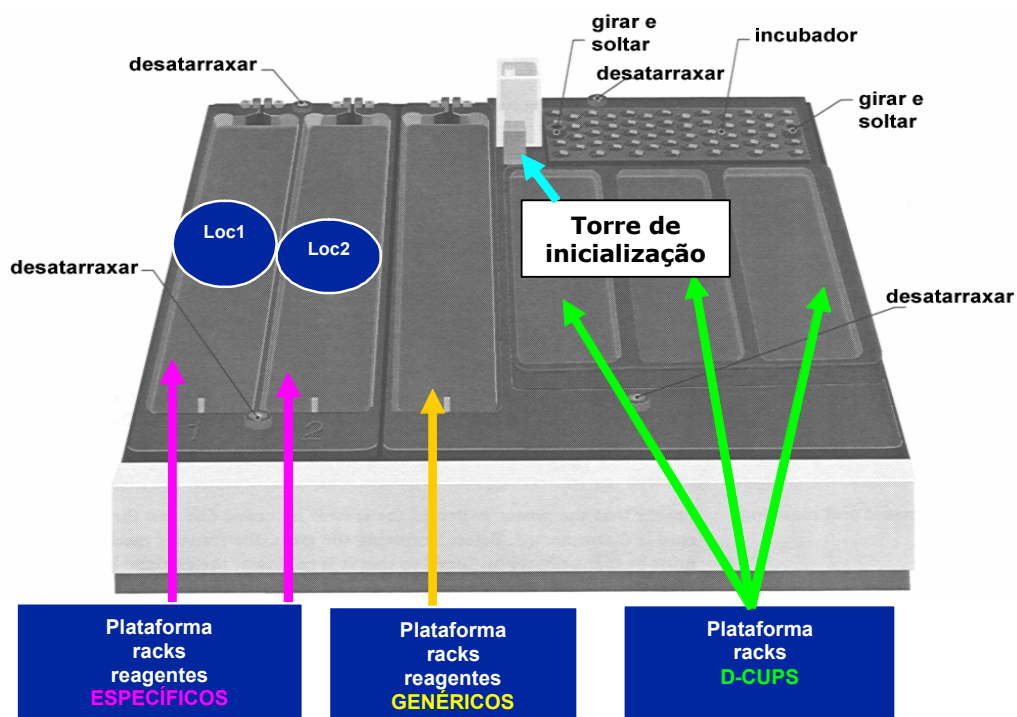


Figura 1

- Soltar o bloco incubador pressionando para baixo os dois botões de retenção. **(Figura 1)**
- Levantar o bloco da sua base. Limpar o bloco com um pano úmido e secar com pano seco. Cuidado para não molhar a resistência.
- Limpar os orifícios do bloco incubador com cotonete úmido.
- Remover a bandeja de reagentes genéricos/D-cups, desatarraxando os dois parafusos, levantando a bandeja livre do sistema.
- Limpar a bandeja com um pano úmido e em seguida com um pano seco.
- Posicionar as plataformas e bloco incubador limpos e secos.
- Limpar a torre de inicialização com um pano úmido e depois secar cuidadosamente com outro seco.

## Remoção e limpeza da roda de lavagem

- Desligar o Cobas Amplicor.
- Acessar a roda de lavagem levantando a tampa principal e o teclado do Cobas Amplicor. A roda de lavagem ficará visível.
- Girar as torres de lavagem (brancas) no sentido horário de modo que as mesmas se afastem do centro da roda de lavagem.
- Remover a roda de lavagem desatarraxando o parafuso do centro da roda, separando a roda do sistema (**Figura 2**).
- Cuidar para não entortar as ponteiros de aspiração ou de ressuspensão.
- Limpar a roda de lavagem com um pano úmido e secar com outro seco.
- Recolocar a roda de lavagem, fazendo o processo inverso descrito acima.
- Voltar as torres brancas girando no sentido anti-horário, percebendo quando há o encaixe perfeito. Caso não fique bem posicionada, quando uma rotina for colocada os D-cups poderão ficar presos na torre e perderá a reação que foi iniciada.

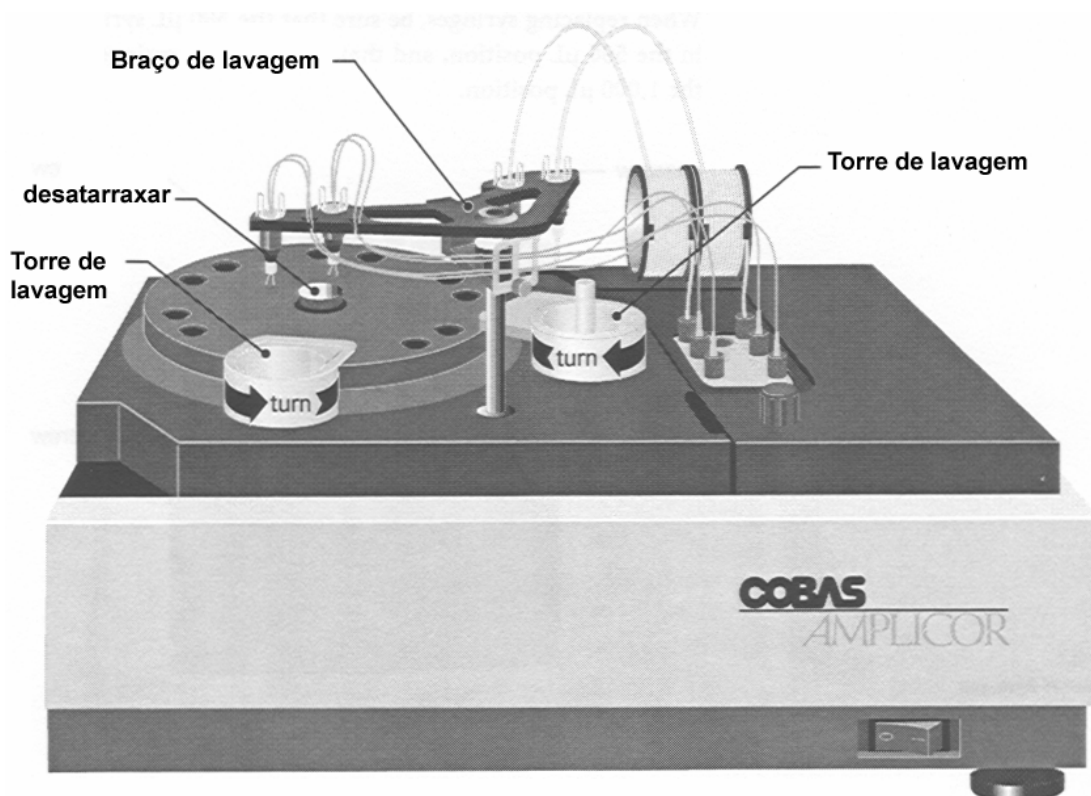
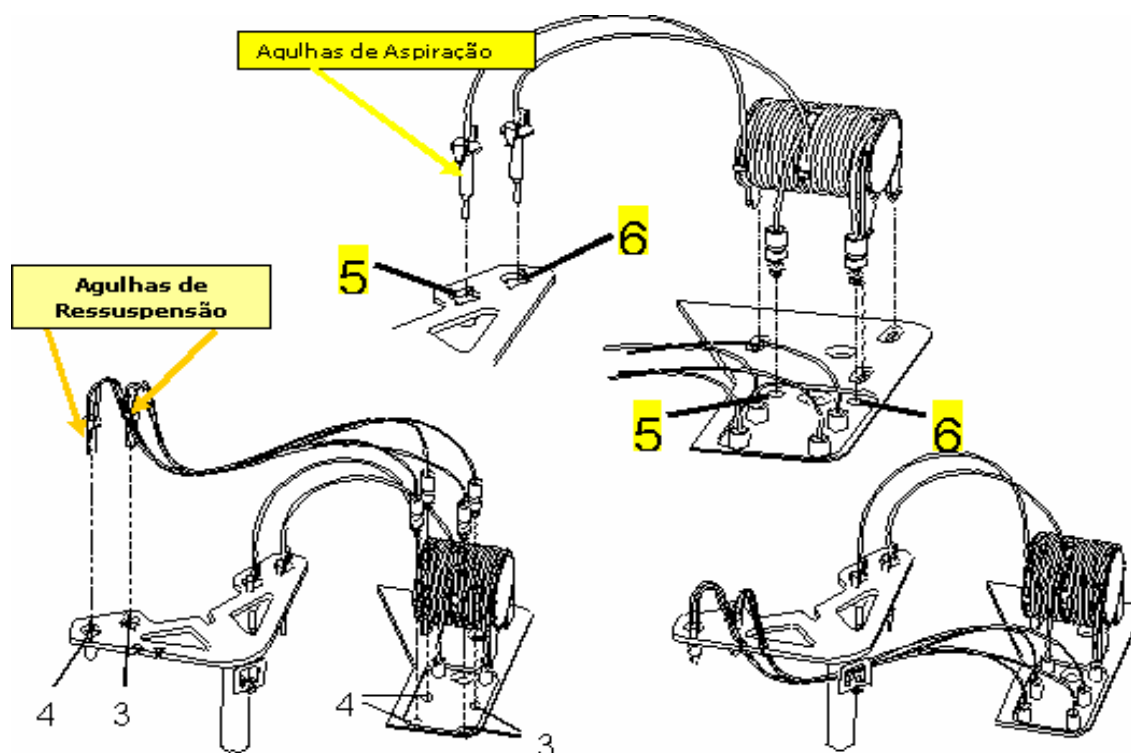


Figura 2

### Troca das ponteiros (agulhas) da estação lavagem

- Desligar o Cobas Amplicor.
- Acessar a roda de lavagem abrindo a tampa principal do Cobas Amplicor e levantar o teclado. As ponteiros (agulhas) de aspiração e de ressuspensão ficarão visíveis. (**figura 3**)
- As agulhas de **Ressuspensão** e a tubulação de conexão são recolocadas individualmente.
- Remover as agulhas de **Ressuspensão** soltando-as pressionando o grampo no topo da braço de lavagem, e depois retirando as agulhas de sua posição.
- Desatarraxar o encaixe do outro extremo da tubulação para desconectá-la totalmente.
- Substituir as ponteiros de **Ressuspensão** por peças novas, procedendo de maneira inversa da desmontagem
- Ao substituir a tubulação, certificar-se de que cada terminal da tubulação esteja bem conectado na posição determinada aos números correspondentes do braço (3 e 4).

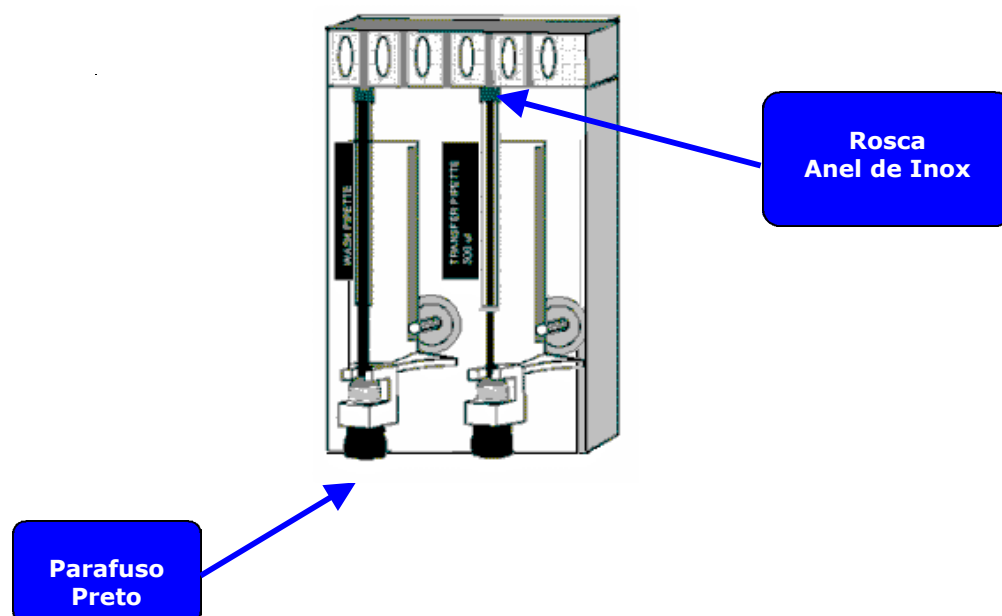


### Figura 3

Posicionar os êmbolos das seringas procedendo da seguinte maneira:

- Ligar o Cobas Amplicor.
- Pressionar **SYSTEM** até aparecer na tela **SY-Diag**.
- Pressionar **2 (Device Check)**.
- Pressionar **1**.
- Pressionar **3 (Syringe Exchange)**.
- Pressionar **START** para posicionar os êmbolos.
- Desligar o Cobas Amplicor.
- Ou deixar o Cobas Amplicor desligado e elevar com cuidado o êmbolo manualmente.
- Remover e trocar uma seringa por vez.
- Acessar as seringas abrindo a tampa principal do Cobas Amplicor e depois levantando o teclado. A seringa de 500  $\mu\text{L}$  e a seringa de 1000  $\mu\text{L}$  estarão visíveis. Vide a **figura 4** para os detalhes de montagem da seringa.
- Desatarraxar a parafuso preto no sentido horário.
- Desatarraxar a rosca do anel de inox no topo da seringa no sentido horário e remova a seringa de sua posição. (**figura 4**)
- Remover o êmbolo de inox da seringa e remova o **Teflon** e o **O-ring** do êmbolo utilizando o suporte de acrílico que é acessório do equipamento.
- Recolocar o **O-ring** e o **Teflon** com partes novas, não apertar demais os parafusos.
- Limpar a seringa se necessário com água destilada.
- Testar se o êmbolo flui livremente na seringa, caso haja resistência verificar se o **Teflon** está torto e se necessário trocar novamente.
- Ao recolocar as seringas, certificar-se de que a seringa de 500  $\mu\text{L}$  esteja colocada na posição da seringa de 500  $\mu\text{L}$  e que a seringa de 1000  $\mu\text{L}$  esteja colocada na posição da de 1000  $\mu\text{L}$ .
- Fazer um **Prime Estendido** e verificar se há vazamentos.



**Figura 4**

### Troca do filtro do tampão de lavagem

- Certificar-se de que o Cobas Amplicor esteja desligado e o cabo de força esteja desconectado.
- Remover a tampa e as tubulações do reservatório de lavagem e coloque-o no suporte de acrílico da tubulação.
- Desatarraxar o filtro branco Porex conectado na extremidade da mangueira no sentido horário.
- Limpar ou instalar um filtro novo girando-o cuidadosamente em sentido horário, até sentir uma resistência (aprox. 10 mm).
- Recolocar as tubulações do reservatório de lavagem no galão.
- Conectar o cabo de força e ligar o sistema.
- Fazer um **Prime Estendido**.

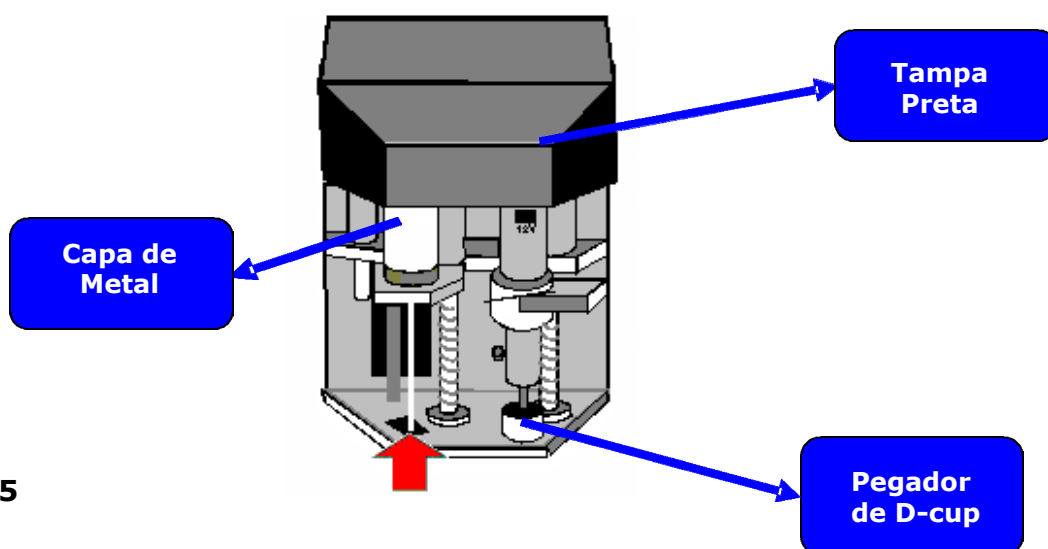


Figura 5

### Troca da ponteira (Agulha) de transferência

- Desligar o Cobas Amplicor
- Vide Figura 5 para os detalhes referentes à montagem da ponteira de transferência.
- Levantar e remover a tampa preta do topo do mecanismo de transferência.
- Soltar a capa de metal do conjunto desatarraxando-a (etapa 1 da figura 6)
- Girar e levantar a capa de metal – (etapa 1 e 2 da figura 6).
- Girar a agulha 90° no sentido anti-horário - (etapa 3 da figura 6).
- Levantar a agulha cuidadosamente - (etapa 4 da figura 6).
- Trocar a agulha fazendo o processo inverso.
- Fazer um **Prime Estendido**.

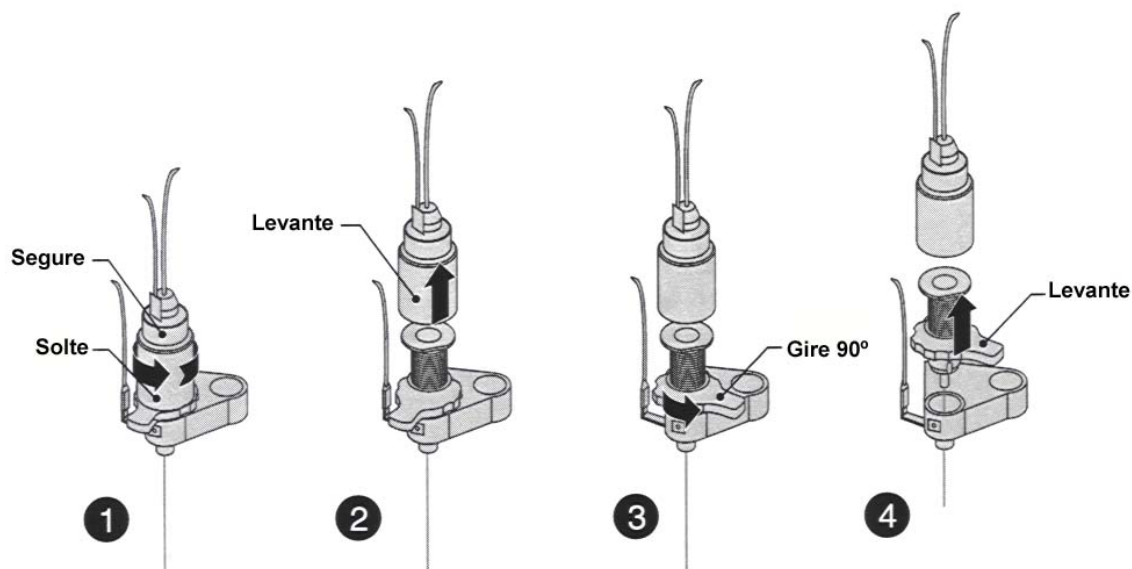


Figura 6

### Zerar a Contagem da Seringa

- Pressionar **SYSTEM** até aparecer na tela **SY-Diag**.
- Pressionar **■**
- Pressionar **3** Instrument Run Info.
- Pressionar **■** (SYR 1:xxxxxxx SYR 2:xxxxxxx)
- xxxxxx representa a contagem de cada seringa.
- Pressionar **EDIT**.
- Pressionar **SHIFT** e **SPACE** simultaneamente para zerar a contagem.
- Confirmar pressionando **SHIFT** e **ENTER** simultaneamente.
- Verificar se a contagem foi apagada.
- Repetir todo o processo para a segunda seringa.
- Pressionar **ESCAPE**.

## 7. Procedimentos Básicos de Análise e Interpretação de Resultados

Validação da corrida:

Verificar se na impressão de resultados, há alguma mensagem ou comentário em relação aos controles. **Não** é válida uma corrida se houver os seguintes comentários para os controles HIV-1 Monitor:

Flag	Comentário	INTERPRETAÇÃO
-Q-	<b>QS_INVALID</b>	Os valores de absorbância do QS estão fora do intervalo.
-N-	<b>NC_INVALID</b>	O valor de $A_{660}$ para o controle negativo está fora do intervalo aceitável.
-L-	<b>LPC_INVALID</b>	O valor para o controle positivo baixo está fora do intervalo aceitável.
-H-	<b>HPC_INVALID</b>	O valor para o controle positivo alto está fora do intervalo aceitável.
	<b>OD_SEQUENCE</b>	Indica um valor de $A_{660}$ do alvo fora da seqüência. Nenhum valor será calculado, repetir todo procedimento, extração de amostras e controles, amplificação e detecção.
	<b>QS_SEQUENCE</b>	Indica um valor de $A_{660}$ do QS fora da seqüência. Nenhum valor será calculado, repetir todo procedimento, extração de amostras e controles, amplificação e detecção.

Se uma corrida for **inválida repetir** todo procedimento, extração amplificação e detecção.

O Cobas Amplicor resultados de  $A_{660}$  junto com o valor do número de cópias para amostras e controles. O valor de  $A_{660}$  para as diluições seriadas do alvo e do QS devem seguir um valor de decréscimo com aumento do fator de diluição, exceto para valores  $A_{660}$  de diluições que ultrapassam o intervalo linear do teste (amostras com altos títulos ou para diluições) ou valores próximos da leitura de fundo (amostras com baixos títulos).

### Diluições do Amplicon HIV-1

Diluições do Amplicon HIV-1 1=pura, 2=1:9, 3=1:81, 4=1:729. Os valores da diluição da absorbância devem diminuir com a diluição seriada, com valor mais alto na primeira diluição (pura) e mais baixo na última (1:729). Se os valores  $A_{660}$  do HIV-1 não estão em seqüência, uma mensagem de erro **OD SEQUENCE** aparecerá para amostras ou controles

Flag	Comentário	INTERPRETAÇÃO
-Q-	<b>QS_INVALID</b>	Os valores de absorbância do QS estão fora do intervalo.
-N-	<b>NC_INVALID</b>	O valor de $A_{660}$ para o controle negativo está fora do intervalo aceitável.
-L-	<b>LPC_INVALID</b>	O valor para o controle positivo baixo está fora do intervalo aceitável.
-H-	<b>HPC_INVALID</b>	O valor para o controle positivo alto está fora do intervalo aceitável.
	<b>OD_SEQUENCE</b>	Indica um valor de $A_{660}$ do alvo fora da seqüência. Nenhum valor será calculado, repetir todo procedimento, extração de amostras e controles, amplificação e detecção.
	<b>QS_SEQUENCE</b>	Indica um valor de $A_{660}$ do QS fora da seqüência. Nenhum valor será calculado, repetir todo procedimento, extração de amostras e controles, amplificação e detecção.

Se uma corrida for **inválida repetir** todo procedimento, extração amplificação e detecção. O Cobas Amplicor resultados de  $A_{660}$  junto com o valor do número de cópias para amostras e controles. O valor de  $A_{660}$  para as diluições seriadas do alvo e do QS devem seguir um valor de decréscimo com aumento do fator de diluição, exceto para valores  $A_{660}$  de diluições que ultrapassam o intervalo linear do teste (amostras com altos títulos ou para diluições) ou valores próximos da leitura de fundo (amostras com baixos títulos).

### Diluições do Amplicon HIV-1

Diluições do Amplicon HIV-1 1=pura, 2=1:9, 3=1:81, 4=1:729. Os valores da diluição da absorbância devem diminuir com a diluição seriada, com valor mais alto na primeira diluição (pura) e mais baixo na última (1:729). Se os valores  $A_{660}$  do HIV-1 não estão em seqüência, uma mensagem de erro **OD SEQUENCE** aparecerá para amostras ou controles

## Diluições do Amplicon QS

Diluições do Amplicon HIV-1 1=pura, 2=1:9. Se o valor da  $A_{660}$  para diluição 2=1:9 for maior que o valor da primeira diluição=pura, um erro ocorreu e QS\_SEQUENCE aparecerá na impressão do resultado. O resultado para amostras ou controles é inválida. Repetir todo procedimento (processamento de amostras, amplificação e detecção para essa amostra ou controle).

## INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS COM VALORES $A_{660}$ FORA DA SEQÜÊNCIA

- Valores de absorvância para diluições do amplicon do HIV-1 devem seguir um padrão de decréscimo dos valores de  $A_{660}$  com o aumento do fator de diluição, exceto para diluições que estão saturadas e diluições com valor de leitura de fundo.
- Em reações contendo altas cópias HIV-1/mL diluições tubo 1,2 e 3 podem ser saturadas resultando em valores de  $A_{660}$  mais baixos. Esses valores são válidos mesmo não apresentando valores de  $A_{660}$  para diluições do tubo 1 ao tubo 4.
- Em reações contendo alta quantidade de cópias HIV-1/mL diluições tubo 1,2 e 3 podem ser saturadas resultando em valores de  $A_{660}$  mais baixos. Esses valores são válidos mesmo não apresentando valores de  $A_{660}$  para diluições do tubo 1 ao tubo 4.
- Em reações contendo baixa quantidade de cópias HIV-1/mL diluições tubo 2 e 3 e 4 podem conter valores de  $A_{660}$  de leitura de fundo. Esses valores são válidos mesmo não apresentando valores de  $A_{660}$  para diluições do tubo 1 ao tubo 4.
- Todas as diluições com valores de  $A_{660}$  entre 0.15 e 2.0 devem seguir um padrão de decréscimo de valores de  $A_{660}$  para as diluições do tubo 1 ao tubo 4. Caso as diluições não sigam esse padrão ocorreu um erro. O resultado desse controle ou amostra é inválido, repetir o processamento da amostra, amplificação e detecção, para essa amostra.

**Exemplos de resultados de  $A_{660}$  fora da seqüência:**

	<b><math>A_{660}</math> do Alvo ( Fator de Diluição)</b>				<b><math>A_{660}</math> do QS (Fator de Diluição)</b>		<b>Interpretação dos resultados</b>
	<b>1:1</b>	<b>1:9</b>	<b>1:81</b>	<b>1:729</b>	<b>1:1</b>	<b>1:9</b>	
<b>Exemplo 1</b>	<b>2.578</b>	<b>3.603</b>	<b>3.201</b>	<b>*0.700</b>	<b>2.618</b>	<b>*0.397</b>	<b>Válido: Amostra com alto título de absorbância, acima do intervalo linear</b>
<b>Exemplo 2</b>	<b>*0.216</b>	<b>0.004</b>	<b>0.016</b>	<b>0,007</b>	<b>3.436</b>	<b>*0.743</b>	<b>Válido: amostra com baixo título de absorbância ou próximo do limite de detecção.</b>
<b>Exemplo 3</b>	<b>0.002</b>	<b>0.007</b>	<b>0.004</b>	<b>0.339</b>	<b>4.218</b>	<b>*0.883</b>	<b>Inválido: aparecerá uma mensagem OD_SEQUENCE.</b>
<b>Exemplo 4</b>	<b>3.052</b>	<b>1.597</b>	<b>3.394</b>	<b>2.887</b>	<b>1.357</b>	<b>*0.158</b>	<b>Inválido: aparecerá uma mensagem OD_SEQUENCE.</b>
<b>Exemplo 5</b>	<b>0.016</b>	<b>0.267</b>	<b>0.007</b>	<b>0.004</b>	<b>3.612</b>	<b>*0.793</b>	<b>Inválido: aparecerá uma mensagem OD_SEQUENCE.</b>

**Resultados liberado pelo Cobas Amplicor**

```

----- Result Inspection -----

```

RingID	T#	T	SpecimenID	QS#	Target	Absorbances	Test	Titer	FLG	Comment	Time completed	QS	Absorbances
278	1	S	30093870	62	0.003	0.006	HIM	*.**E*	___	TARGETOD_LO	1.JUN 04 20:59	2.491	0.004
													0.004
278	2	S	30093873	62	0.004	0.005	HIM	*.**E*	___	TARGETOD_LO	1.JUN 04 21:06	1.443	0.007
													0.004
278	3	S	30093889	62	*0.504	0.060	HIM	4.07E2	___		1.JUN 04 21:13	2.150	0.006
													0.008
278	4	S	30094015	62	*0.299	0.033	HIM	1.15E2	___	RESULT_LO	1.JUN 04 21:21	3.137	0.004
													0.007
278	5	S	30094017	62	0.006	0.004	HIM	*.**E*	___	TARGETOD_LO	1.JUN 04 21:28	1.986	0.005
													0.005



## OUTROS COMENTÁRIOS RELACIONADOS AOS RESULTADOS DE TESTES QUANTITATIVOS

Comentário	INTERPRETAÇÃO
<b>RESULT_LO</b>	Os valores do QS e da amostra estão dentro do intervalo do ensaio, mas o valor calculado está abaixo do limite inferior do intervalo linear do teste.
<b>RESULT_HI</b>	Os valores do QS e da amostra estão dentro do intervalo do ensaio, mas o valor calculado está acima do limite superior do intervalo linear do teste.
<b>TARGETOD_LO</b>	Todos os valores de absorbância da amostra estão abaixo do intervalo de OD do ensaio.
<b>TARGETOD_HI</b>	Todos os valores de absorbância da amostra estão acima do intervalo de OD do ensaio.
<b>TARG_RANGE</b>	Todos os valores de absorbância da amostra estão fora do intervalo de OD do ensaio.
<b>BLANKHIGH</b>	A absorbância do blank do substrato está muito alta.
<b>TCRANGE</b>	O perfil do termociclador está fora de especificação.
<b>QCERROR</b>	As absorbâncias dos controles estão fora de especificação.
<b>RGTEXPIRED</b>	Um ou mais reagentes usados para o teste está vencido.
<b>REAGTEMP</b>	A temperatura da plataforma de reagentes está fora de especificação.
<b>INCUBTEMP</b>	A temperatura da incubadora está fora de especificação.
<b>CALCERROR</b>	Erro de cálculo da absorbância.
<b>PHRANGE</b>	Erro de intervalo do fotômetro.
<b>ABORTED</b>	O teste foi abortado.
<b>CONJEMPTY</b>	O cassete de conjugado está vazio.
<b>TREAGEMPTY</b>	O cassete de reagente específico está vazio.

## **8 Problemas, Causas e Soluções na Realização dos Testes – códigos de erro do equipamento**

### Lista de Problemas e Soluções do Cobas Amplicor

Objetivos é Identificar problemas, erros ou mensagens no Analisador Cobas Amplicor, determinar as prováveis causas dos problemas, erros ou mensagens, realizar ações corretivas adequadas

OBS:

As mensagens marcadas com fundo amarelo referem-se aos problemas mais freqüentes atendidos na CARD.

**MENSAGENS DO ANALISADOR (POR COMPONENTE OU FUNÇÃO)**

Componente/ Função	Condição/ Mensagem	Causa Provável	Ação Corretiva
<b>A-ring</b>	A-ring already cycled	A amplificação do A-ring em questão já foi realizada.	Verificar a identificação do A-ring e se as amostras foram desnaturadas.
	A-ring amplification error	O perfil do TC está fora da especificação.	Verificar usando o menu TC-QC e se necessário contactar a CARD
	A-ring not cycled	O A-ring que está sendo colocado no sistema p/ detecção não foi amplificado.	Verificar a identificação do A-ring ou realizar a amplificação do mesmo.
	A-ring on DP pos has not been cycled, to continue push <START> twice	O A-ring que está sendo colocado no DP do sistema não foi amplificado.	Verificar a identificação do A-ring. Se a amplificação não for necessária Pressionar <START> duas vezes.
	Duplicate number	A identificação do número do A-ring foi previamente usada no sistema.	Verificar a identificação do A-ring.
	Load A-rings into proper position	O A-ring não foi colocado na posição correta.	Colocar o A-ring na posição correta.
	Not unique	A identificação do número do A-ring foi utilizada anteriormente.	Verificar a identificação do A-ring ou use uma identificação diferente.
<b>Cover</b>	MainCoverOpen	A tampa principal do Sistema está aberta.	Fechar a tampa do sistema.
<b>D-cups</b>	At end of run, D-cup has excessive volume (>300µL)	As conexões dos tubos de aspiração ou ressuspensão estão incorretas.	Observar a orientação das conexões (#3 com #3, #4 com #4, etc.) Verificar se as conexões do braço de lavagem estão presas.
		As seringas de 500 µL e 1000 µL estão invertidas.	Posicionar as seringas corretamente.
		As agulhas de aspiração ou ressuspensão podem estar obstruídas.	Verificar se os tubos de aspiração e ressuspensão estão dobrados ou obstruídos.
	Bubbles or foam present in D-cups	Há bolhas de ar no sistema de fluido.	Verificar: 1- o sistema de fluido quanto a bolhas de ar no sistema 2- o nível do reservatório do tampão de lavagem 3- a posição da tubulação do reservatório (se está na altura ideal) e a condição do filtro Porex. Realizar <b>Extended Prime</b> .

		A agulha está entupida.	Realizar <b>Extended Prime</b> e verificar se há vazamento de tampão. Após o Extended Prime, se a agulha continuar entupida troque-a por uma nova.
	Close instrument cover and TC cover	Uma das tampas dos termocicladores está aberta.	Fechar e travar as tampas dos termocicladores.
	D-cups are not handled properly	D-cup apresenta defeito.	Verificar se os D-cups apresentam algum defeito e substituí-los, se necessário.
		Rack de D-cups está mal posicionada.	Posicionar a rack de D-cups corretamente na plataforma.
Componente/ Função	Condição/ Mensagem	Causa Provável	Ação Corretiva
	D-cup could not be released	Durante a detecção, o sistema não pode soltar o D-cup e a corrida foi então abortada.	Limpar o pegador de D-cup. Verificar se há algum impedimento do movimento. Contactar a CARD se o problema persistir.
	D-cup missing (261)	Falta D-cup.	Verificar se falta D-cup ou se há algum preso no pegador de D-cup.
		D-cup apresenta defeito.	Verificar se o D-cup está íntegro ou se apresenta algum defeito.
		A rack de D-cup não está bem posicionada.	Verificar se a rack de D-cups está bem posicionada na plataforma. Reiniciar o sistema para limpeza. Colocar uma nova rack de D-cup e Pressionar <START> novamente.
	Not enough D-cups found	O número de D-cups colocado no sistema não é suficiente para realizar os testes solicitados.	Adicionar racks de D-cups no sistema.
	Press ESC and then start to clean up	Ocorreu um erro que necessita da retirada dos D-cups que estavam em processo antes da corrida ser abortada.	Pressionar ESCAPE e depois START para iniciar a retirada dos tubos do sistema. <b>Não retirar nenhum D-cup manualmente.</b>
<b>Display</b>	Keypad display screen lights up, but text is not present	O cartucho do software não está posicionado adequadamente.	Verifique se o cartucho está bem posicionado no seu encaixe.
<b>Electronics</b>	Change CPU board battery not present	A bateria que supre a memória do CPU está baixa.	Contactar a CARD.
	Not enough RAM available	Há um problema de memória.	Contactar a CARD.
	RAM error	Há um problema de memória.	Contactar a CARD.

<b>ID</b>	Invalid user ID	O operador deve se "logar" ao sistema.	Digitar a identificação do operador e sua senha.
	Duplicate number	O nº de identificação do A-ring já foi usado anteriormente.	Verificar a identificação do A-ring em questão.
	Not unique	O nº de identificação já foi usado anteriormente.	Verificar a identificação do A-ring ou use um número diferente.
<b>Load Check</b>	Blank	Mensagem liberada no <i>loadcheck</i> junto com "blank error" para indicar que o cassete atual apresenta uma alta leitura do <i>blank</i> .	Colocar um cassete novo de substrato preparado recentemente. Verificar a presença de bolhas no D-cup.
<b>Componente/ Função</b>	<b>Condição/ Mensagem</b>	<b>Causa Provável</b>	<b>Ação Corretiva</b>
	Blank error	Mensagem liberada no <i>loadcheck</i> , para indicar que o cassete de substrato está fora da leitura aceitável para o <i>blank</i> .	Colocar um cassete novo de substrato preparado recentemente.
	Cover wet	Líquido ou bolhas foram detectadas na tampa do cassete.	Limpar a tampa do cassete com papel absorvente. <b>Não agitar os reagentes.</b>
	Empty	Mensagem liberada no <i>loadcheck</i> para indicar que o cassete de reagente está vazio.	Realizar um <b>STOP TRANSFER</b> e colocar no sistema um novo cassete de reagente. Pressionar <b>&lt;START&gt;</b> para recomeçar a corrida.
	Expired	Indica que o reagente está vencido.	Realizar um <b>STOP TRANSFER</b> e adicionar um novo cassete de reagente. Pressionar <b>&lt;START&gt;</b> para recomeçar a corrida.
	<b>FAILED</b>	Mensagem liberada no <i>loadcheck</i> quando um erro ou inconsistência ocorreu.	Verificar as outras mensagens impressas no <i>loadcheck</i> .
	Insufficient reagent found. ___ tests available	Não há reagente suficiente para os testes solicitados na ordem de trabalho.	Adicionar um outro cassete de reagente.
	Load inconsistency: All tests finished	A lista de trabalho do A-ring foi realizada.	Criar uma nova lista de trabalho para o A-Ring.
	Load inconsistency: Con reagent not loaded	O conjugado não foi colocado na rack de reagentes.	Adicionar suficiente cassete de conjugado.
	Load inconsistency: cover open	Uma das tampas dos termocicladores está aberta.	Fechar e travar todas as tampas dos termocicladores.
	Load inconsistency: DN reagent not loaded	O reagente de desnaturação não foi colocado na rack.	Adicionar reagente de desnaturação.
	Load inconsistency: Dilution reagent not	O reagente de diluição do amplicon não foi colocado na	Colocar cassetes de reagente de diluição do amplicon

	loaded	rack.	suficientes para o teste.
	Load inconsistency: no generic reagent rack in loadlist	O número da rack de reagentes genéricos não foi informado ao sistema.	Criar uma rack de reagentes genéricos. Posicionar a rack com reagentes genéricos na plataforma.
	Load inconsistency: reagent not loaded	O nº da rack de reagente específico não foi informada ao sistema.	Criar uma rack de reagente específico.
		Não foi adicionado reagente específico suficiente para a detecção.	Colocar na rack o reagente específico e posicioná-la na plataforma.
	Load inconsistency: Sub reagent not loaded	O substrato não foi adicionado na rack de reagentes.	Adicionar cassetes de substrato suficientes.
<b>Componente/ Função</b>	<b>Condição/ Mensagem</b>	<b>Causa Provável</b>	<b>Ação Corretiva</b>
	Load inconsistency: (TCA, TCB, DP1 or DP2) order not found	Não foi criada uma ordem para o(s) A-ring(s) em questão.	Criar uma lista de trabalho para o A-Ring. Fazer o <i>load</i> do A-Ring.
	Low vol	O volume do reagente indicado ou tampão de lavagem está baixo.	Realizar um <b>STOP TRANSFER</b> e adicionar reagente novo ou tampão de lavagem. Pressionar <b>&lt;START&gt;</b> .
	More than 210 detections loaded	Excedeu a capacidade de detecção de testes na corrida.	Modificar a ordem de trabalho para não exceder 210 testes, incluindo <i>blanks</i> .
	No A-ring in load list	As amostras não foram inseridas no sistema.	Inserir as amostras.
	No specific reagent in load list	A rack de reagente específico não foi inserida.	Inserir reagente específico.
	No test reagent found	O reagente específico necessário para o teste não foi adicionado.	Inserir reagente específico.
	Not enough D-cups	Número insuficiente de D-cups para a corrida.	Adicionar racks de D-cups
	Not enough generic/test reagent	Não há reagente específico suficiente para a corrida.	Realizar um <b>STOP TRANSFER</b> e adicionar cassetes de reagentes. Pressionar <b>&lt;START&gt;</b> .
	Reagent missing, load and start	Não foi adicionado um reagente necessário para realizar o teste solicitado.	Realizar um <b>STOP TRANSFER</b> e adicionar cassetes de reagentes. Pressionar <b>&lt;START&gt;</b> .
	PASSED	Não ocorreu erro no <i>loadcheck</i> .	Nenhuma ação é necessária. Esta é uma mensagem confirmatória.
	Specific reagent rack	Um reagente específico não	Posicionar o reagente na

	1 pos ___ empty	foi adicionado na rack da posição # 1 da plataforma, posição ___ ausente	rack.
	Specific reagent rack 2 pos ___ empty	Um reagente específico não foi adicionado na rack da posição # 2 da plataforma, posição ___ ausente.	Posicionar o reagente na rack.
	Specific reagent rack 3 pos ___ empty	Um reagente específico não foi adicionado na rack # 3 da rack da posição plataforma, posição ___ ausente.	Posicionar o reagente na rack.
<b>Operation</b>	File in use, modification not saved	Os arquivos estão protegidos e o processo desejado não pode ser realizado.	Esperar o término da corrida até aparecer na tela <i>Standby</i> ou use <b>STOP TRANSFER</b> .
	Run clean-up in process	O sistema está retirando os tubos de uma corrida abortada. Se foi realizada com sucesso o sistema retorna para STANDBY.	Aguardar o término do processo. <b>Não retirar manualmente os D-Cups.</b>
<b>Componente/ Função</b>	<b>Condição/ Mensagem</b>	<b>Causa Provável</b>	<b>Ação Corretiva</b>
<b>Orders</b>	Accept or enter the QS copy # first	Um novo número de cópias # não foi adicionado na ordem.	Inserir o número de cópias # do QS correto.
	Database full	A memória do sistema não tem espaço para adicionar mais informações.	Os resultados de algumas ordens de trabalho deverão ser apagadas.
	No reflex tests possible	Não pode configurar controles para o <i>reflex tests</i> .	Para fazer o <i>reflex test</i> para controles, mudar o tipo de amostra de <b>C</b> para <b>S</b> na lista de trabalho.
	No tests ordered for A-ring	Não há ordem para este A-ring específico.	Verificar a identificação do A-ring e o arquivo de ordens.
	Only control tests allowed	A designação do controle não foi selecionada.	Refazer a ordem com o sinal apropriado para designar os controles -, +, #.
	Order entry error, test xx. Test file does not exist	A ordem para este teste não foi criada.	Verificar a identificação do teste selecionado. Rever o <i>test file</i> para assegurar que o teste existe. Inserir o arquivo do teste.
	Order does not exist	A ordem de trabalho indicada não foi criada.	Verificar a identificação da ordem de trabalho e fazer uma ordem, se necessário.
	Order has no results	Esta ordem não tem resultado ainda.	Verificar a ordem em questão.
	Order just modified by host	A ordem de trabalho foi modificada pelo <i>host</i> do computador (somente quando conectado ao LIS).	Nenhuma ação é necessária.
	Order locked, try later	A ordem selecionada está sendo realizada pelo sistema	Esperar o término da corrida e tentar novamente.

		e não pode ser modificada neste momento.	
	Order not found	A ordem de trabalho não existe.	Fazer a ordem.
	Profile already exists. To confirm press <SHIFT><ENTER>	Este número de perfil que está sendo criado já existe.	Colocar o número do perfil e Pressionar <SHIFT> <ENTER> para reescrever um perfil existente ou escolher um número novo.
<b>Power</b>	Power/init error	O sistema não pode iniciar.	Verificar os fusíveis e ligar para a CARD.
	The Analyzer does not operate after the power is switched ON	O sistema não está recebendo corrente elétrica.	Verificar: 1- se o fio do sistema está conectado na tomada e no sistema 2- se está sendo usada a fonte de corrente elétrica correta 3- se a tomada está funcionando 4- fusível.
<b>Componente/ Função</b>	<b>Condição/ Mensagem</b>	<b>Causa Provável</b>	<b>Ação Corretiva</b>
	The system starts but does not initialize	A tampa principal do sistema está aberta.	Feche a tampa principal.
	Close TC Cover message is displayed	A tampa do termociclador ou da posição de detecção está aberta.	Fechar a tampa dos termocicladores e das posições de detecção.
		A agulha está gotejando.	Vide "Transfer Tip".
		A agulha está torta ou molhada.	Vide "Transfer Tip".
	Turn off instrument (427)	Erro no pegador de D-cup. A rack não está na posição. A agulha está torta.	Desligar o sistema. Corrigir o problema. Colocar uma rack de D-cup vazia, ligar o aparelho e os D-cups serão retirados automaticamente.
<b>Printer</b>	The printer does not operate after the power is switched ON	A impressora não está conectada ao COBAS AMPLICOR ou não está recebendo energia elétrica.	Verificar: 1- se a impressora está conectada ao sistema 2- se está ligada à tomada 3- a configuração da impressora no analisador.
<b>Reagent</b>	Cassette not unique pos ____	A identificação do cassete foi inserida duas vezes para a mesma rack de reagentes.	Apagar o cassete se necessário e cadastrar novamente.
		O cassete existe em duas racks de reagentes e ambas estão no sistema.	Apagar o reagente de uma das racks.
	Cover wet	Líquido ou bolhas foram detectados na tampa do cassete.	Secar com um papel absorvente e não agitar o reagente ao inseri-lo na rack.



	Empty	O cassete está vazio.	Adicionar novo cassete ao sistema.
	Expired	Vencido o prazo de validade do reagente.	Colocar novo reagente.
		A data e/ou hora do sistema estão incorretos.	Verificar a hora e data do sistema.
	Format error	O cassete foi inserido incorretamente via teclado.	Colocar a identificação correta do cassete.
	High Substrate Blank	Agulha obstruída.	Verificar o D-cup usado para o <i>blank</i> substrato em relação a bolha ou espuma e volume do substrato no D-cup (300µL).
		O reagente está contaminado ou vencido.	Trocar o cassete de substrato e reiniciar a corrida.
	Level detection statistic warning (278)	Pode haver ar no sistema de tubos.	Realizar o <b>Extended Prime</b> . Limpar e secar a agulha.
		A detecção de nível pode estar desconectada.	Verificar a localização do sensor de nível e conectá-lo, se necessário.
		A concentração do tampão de lavagem pode estar incorreta.	Preparar um tampão de lavagem novo.
<b>Componente/ Função</b>	<b>Condição/ Mensagem</b>	<b>Causa Provável</b>	<b>Ação Corretiva</b>
	No level found, reagent pos ____	O sistema não foi capaz de detectar o reagente.	Adicionar reagente novo quando terminar a corrida.
	Not enough Conjugate reagent (CN) found	O conjugado disponível é insuficiente para a ordem solicitada.	Adicionar outro cassete de conjugado.
	Not enough Denaturant Solution (DN) found	A solução de desnaturação disponível é insuficiente para a ordem solicitada.	Adicionar outro cassete de solução de desnaturação.
	Not enough generic/test reagent	O reagente em questão não é suficiente para realizar a corrida.	Adicionar outro cassete do reagente.
	Not enough Substrate reagent found	Não há suficiente substrato para a ordem solicitada.	Adicionar outro cassete de substrato (SB3).
	Not enough test reagent ____ found	Não há suficiente reagente para realizar a ordem solicitada.	Adicionar outro cassete para o reagente em questão.
	Not unique	O número já foi utilizado anteriormente.	Verificar a identificação ou usar um número diferente.
<b>Reagent Rack</b>	Excessive noise or rattling occurs at the reagent rack	A rack de reagente está colocada incorretamente na plataforma.	Reposicionar a rack de reagentes na plataforma.
		A plataforma da rack de reagente na plataforma não está posicionada seguramente.	Apertar os parafusos que prendem a plataforma.
	Generic reagent rack not defined	Os reagentes que estão na rack de reagentes genéricos	Cadastrar os reagentes genéricos.

		não foram cadastrados.	
	Generic reagent rack pos ____ empty	O reagente genérico que foi adicionado na rack não está presente.	Posicionar o reagente na rack.
	Not unique	O número de identificação da rack foi utilizado anteriormente.	Verificar a identificação ou usar um número diferente.
	Rack not present	A rack não está localizada na sua posição programada.	Verificar se todas as racks de reagentes necessárias estão posicionadas.
		A rack de reagente está posicionada incorretamente na plataforma.	Verificar a posição correta da rack na plataforma.
		O sensor da rack está danificado.	Verificar o sensor.
	Rack type mismatch	Foi adicionado um reagente genérico na rack de reagente específico ou vice-versa.	Inserir o reagente genérico na rack de reagente genérico e o reagente específico na rack de reagente específico.
		A rack foi cadastrada na posição errada, no menu <i>load</i> .	Cadastrar o tipo de rack de reagente correta.
<b>Results</b>	All tests finished	Os testes solicitados já terminaram.	Verificar a identificação das amostras.
<b>Componente/ Função</b>	<b>Condição/ Mensagem</b>	<b>Causa Provável</b>	<b>Ação Corretiva</b>
	Database full	O sistema não tem memória para armazenar os dados dos testes solicitados.	Apagar os resultados de algumas ordens anteriores após ter imprimido os resultados a serem arquivados.
	Delete not allowed, result(s) exist	Os resultados não podem ser purgados se eles não foram impressos ou enviados para o LIS.	Imprimir os resultados ou enviá-los para o LIS antes de purgá-los.
	Modification not allowed, TC in process	Os resultados não podem ser purgados uma vez que os testes estão sendo processados.	Aguardar o término do processo.
	No results to selected order	Os testes para a lista de trabalho selecionada não terminaram e os resultados não estão disponíveis.	Esperar o término dos testes.
	Results not yet available	Os testes para a lista de trabalho selecionados não terminaram e os resultados não estão disponíveis.	Esperar o término dos testes.
<b>Temperature</b>	Rgt temp too high	A temperatura ambiente na plataforma de reagentes excede 38°C.	Reduzir a temperatura ambiente e ligar para a CARD.
<b>Thermal cycler</b>	TC cycling finished with errors	O termociclador está fora da especificação.	Avaliar o desvio usando <i>R-TC-QC menu</i> . Ligar para a CARD.
	Thermal cycler ____ aborted	O sistema automaticamente abortou a amplificação.	Avaliar o desvio. Ligar para a CARD.

	Manually denature	Um erro de <i>hardware</i> no mecanismo de transferência alerta para que os A-rings no TCA e TCB sejam desnaturados manualmente.	Esperar o término da amplificação e adicionar 100 µL do reagente de desnaturação em cada A-tube.
<b>Transfer Mechanism</b>	Transfer not initialized	O mecanismo de transferência não pode iniciar.	<b>Realizar um prime no sistema</b> , limpar e secar o poste de iniciação. Verificar: <ol style="list-style-type: none"> <li>1- a presença de bolhas no reservatório</li> <li>2- impedimento no mecanismo de transferência</li> <li>3- o nível da solução de lavagem.</li> </ol>
<b>Componente/ Função</b>	<b>Condição/ Mensagem</b>	<b>Causa Provável</b>	<b>Ação Corretiva</b>
	TransFluid cmd exec error (225)	Problemas no pegador de D-cup.	Limpar o pegador de D-cup. Verificar: <ol style="list-style-type: none"> <li>1- se há acúmulo de detritos ou umidade no pegador de D-cup</li> <li>2- se as conexões do pegador de D-cup não estão soltas ou quebradas.</li> </ol> Reiniciar o sistema para a retirada de D-cups e adicionar novas racks de D-cups.
		A rack de reagente ou de D-cup está posicionada incorretamente na plataforma.	Verificar a posição correta na plataforma. Recadastrar ou reposicionar de forma correta e reiniciar.
		Defeito no D-cup.	Verificar a integridade do D-cup.
		Nenhum D-cup presente.	Verificar se falta D-cup ou se há D-cup preso no sistema.
		Agulha está torta.	Inspecionar visualmente a agulha e trocar se necessário.

			Verificar o nível do tampão de lavagem.
<b>Transfer Tip</b>	Transfer Tip Wet or Bent (263)	Ar no sistema de fluido	Limpar e secar o poste de iniciação. Secar o excesso de tampão de lavagem na agulha. Verificar: 1- se o volume do tampão de lavagem é suficiente 2- a presença de bolhas de ar nas linhas hidráulicas 3- todas as conexões de fluido atrás do sistema. Realizar <b>Extended Prime</b> .
<b>Componente/ Função</b>	<b>Condição/ Mensagem</b>	<b>Causa Provável</b>	<b>Ação Corretiva</b>
		A agulha está torta.	Verificar: 1- se a agulha está corretamente posicionada e presa 2- se todos os reagentes, racks e D-cups estão corretamente posicionados na plataforma 3- se todas as tampas do cassetes estão totalmente fechadas. Trocar a agulha.
	Transfer Tip Check Failure (264)	A agulha está torta	Trocar a agulha.
		Excessivo ar nas tubulações.	Realizar um <b>Extended Prime</b> .
		O tubo da torre de lavagem está vazio.	Confirmar se o nível do tampão de lavagem está abaixo de 5 mm do topo do tubo da torre. Verificar se há vazamento na torre de lavagem ou no tubo da torre.
	Transfer Tip is dripping	Ar no sistema de fluido.	Limpar o poste de iniciação. Verificar:

			1- se há tampão de lavagem no reservatório 2- seringas, tubos de conexão e a região da estação de lavagem quanto à presença de tampão de lavagem. Realizar um <b>Extended Prime</b> .
Componente/ Função	Condição/ Mensagem	Causa Provável	Ação Corretiva
		Vazamento nos componentes do sistema de fluido ou seringas.	Verificar as seringas quanto a vazamento e ajustá-las, se necessário. Examinar os componentes do sistema de fluido quanto a vazamento.
		A agulha pode estar posicionada incorretamente.	Verificar: 1- as conexões da agulha 2- se a agulha está torta 3- se há depósito de sal na área da agulha. Limpar a agulha e trocá-la, se necessário.
<b>Wash Buffer</b>	Wash reservoir low volume	O sensor de nível pode estar posicionado muito alto.	Reposicionar o sensor ao nível apropriado.
		O nível do tampão de lavagem está baixo.	Encher o reservatório com tampão. Se a amplificação estiver em andamento realizar um STOP TRANSFER e adicionar o tampão de lavagem. Realizar um <b>Extended Prime</b> .
<b>Wash Tower/Wash Wheel</b>	Liquid is present or flooding occurs at the wash wheel	As agulhas de aspiração e ressuspensão não estão devidamente posicionadas.	Verificar: 1- se as agulhas estão devidamente posicionadas no braço de lavagem 2- se as torres de lavagem foram reposicionadas devidamente 3- se que as conexões estão bem ajustadas
		As tubulações podem estar obstruídas.	Verificar se as tubulações do waste estão dobradas ou obstruídas. Remover e secar a roda de lavagem. Secar a área abaixo da roda

Componente/ Função	Condição/ Mensagem	Causa Provável	Ação Corretiva
			de lavagem.
	Washfluid cmd exec error (235)	Os tubos de aspiração ou ressuspensão estão incorretamente posicionados ou desalinhados.	Verificar a correta posição e prender as agulhas no braço de lavagem.
		O braço de lavagem está travado ou a roda de lavagem em movimento.	Manualmente verificar o braço e o movimento da roda de lavagem com o sistema desligado.
		A torre de lavagem não foi posicionada corretamente.	Verificar se a roda de lavagem está posicionada corretamente.
		Há líquido ou espuma na roda de lavagem.	Vide "Liquid is present or flooding occurs at the wash wheel"
<b>Waste container</b>	Waste container high volume	O volume do reservatório de esgoto está acima do nível.	Esvaziar o reservatório de esgoto.
		O sensor não está devidamente posicionado.	Verificar a posição do sensor.
<b>(Miscellaneous)</b>	User Privilege Violation	A ação não é permitida devido ao nível de acesso ao usuário.	Solicitar o acesso a um usuário de maior privilégio.

### MENSAGENS DO ANALISADOR (POR CÓDIGO DO ERRO)

Código	Condição/ Mensagem	Causa Provável	Ação Corretiva	Sinal
005####	RAM Error	Erro no <i>hardware</i>	Contactar a CARD	Bip/Impress.
202	Controller error	Erro no <i>hardware</i>	Contactar a CARD	Bip/Impress.
203####	Percom reset err	Erro no <i>hardware</i>	Contactar a CARD	Bip/Impress.
204####	Percom receive err no addr	Erro no <i>hardware</i>	Contactar a CARD	Bip/Impress.
205####	Error while percom close	Erro no <i>hardware</i>	Contactar a CARD	Bip/Impress.
208	Reagent temperature too high	Temperatura do ambiente acima de 38°C	Reduzir a temperatura Contactar a CARD	Bip/Impress.
209	Incubator temperature too high	Temperatura da incubadora acima de 39°C	Contactar a CARD	Bip/Impress.
210####	TcControl system err	Problema no <i>hardware</i> de controle da temperatura	Contactar a CARD	Bip/Impress.
212####	TcControl percom open err	Problema no <i>hardware</i> de controle da temperatura	Contactar a CARD	Bip/Impress.
213####	TcControl percom send err	Problema no <i>hardware</i> de controle da temperatura	Contactar a CARD	Bip/Impress.
214####	TcControl percom rece err	Problema no <i>hardware</i> de controle da temperatura	Contactar a CARD	Bip/Impress.
215####	TcControl cmd execution err	Problema no <i>hardware</i> de controle da temperatura	Contactar a CARD	Bip/Impress.
216####	TcControl fatal cmd	Problema no <i>hardware</i> de	Contactar a CARD	Bip/Impress.

	err	controle da temperatura		
217####	TcControl reset occurred	Problema no <i>hardware</i> de controle da temperatura	Contactar a CARD	Bip/Impress.
<b>Código</b>	<b>Condição/Mensagem</b>	<b>Causa Provável</b>	<b>Ação Corretiva</b>	<b>Sinal</b>
218####	TcControl fatal event err	Problema no <i>hardware</i> de controle da temperatura	Contactar a CARD	Bip/Impress.
220####	Transfluid system err	Erro no <i>hardware</i> do sistema de transferência de fluido	Contactar a CARD	Bip/Impress.
222####	Transfluid percom open err	Erro no <i>hardware</i> do sistema de transferência de fluido	Contactar a CARD	Bip/Impress.
223####	Transfluid percom send err	Erro no <i>hardware</i> do sistema de transferência de fluido	Contactar a CARD	Bip/Impress.
224####	Transfluid percom rece err	Erro no <i>hardware</i> do sistema de transferência de fluido	Contactar a CARD	Bip/Impress.
225####	Transfluid cmmd exe err	Falta de D-cup	Confirmar se falta D-cup Verificar se há D-cup preso no pegador de D-cup	Bip/Impress.
	Transfluid cmmd exe err	D-cup apresenta defeito	Verificar D-cup	
		D-cup posicionado incorretamente	Verificar posicionamento dos D-cups na plataforma	
		Mal funcionamento do pegador de D-cup	Verificar mola do pegador de D-cup Colocar nova rack de D-cup no sistema e reiniciar	
		Agulha torta	Inspecionar agulha	
		Rack de D-cup posicionada incorretamente	Verificar posicionamento da rack de D-cups na plataforma	
226####	Transfluid fatal cmd err	Erro no <i>hardware</i> do sistema de transferência de fluido	Contactar a CARD	Bip/Impress.
227####	Transfluid reset occurred	Erro no <i>hardware</i> do sistema de transferência de fluido	Contactar a CARD	Bip/Impress.
228####	Transfluid fatal event err	Erro no <i>hardware</i> do sistema de transferência de fluido	Contactar a CARD	Bip/Impress.
230####	WashFluid system err	Erro no <i>hardware</i>	Contactar a CARD	Bip/Impress.
235####	WashFluid cmmd exe err	Tubos de aspiração ou ressuspensão desalinhados	Verificar as agulhas de aspiração e ressuspensão	Bip/Impress.
		Braço ou roda de lavagem travados	Verificar manualmente o braço e a roda de lavagem quanto ao	

Código	Condição/ Mensagem	Causa Provável	Ação Corretiva	Sinal
			movimento, com o sistema desligado	
		Torre de lavagem posicionada incorretamente	Verificar se a torre de lavagem está posicionada corretamente	
		Roda de lavagem molhada ou com espuma	Verificar: 1- o posicionamento das agulhas de aspiração e ressuspensão e torres de lavagem 2- se as conexões estão bem presas 3- se a tubulação do esgoto ( <i>waste</i> ) está obstruída	
236####	WashFluid fatal cmd err	Erro no <i>hardware</i> do sistema de transferência de fluido	Contactar a CARD	Bip/Impress.
237####	WashFluid reset occurred	Erro no <i>hardware</i> do sistema de transferência de fluido	Contactar a CARD	Bip/Impress.
238####	WashFluid fatal event err	Erro no <i>hardware</i> do sistema de transferência de fluido	Contactar a CARD	Bip/Impress.
240####	CommCrtl system err	Erro de comunicação do <i>hardware</i>	Contactar a CARD	Bip/Impress.
242####	CommCrtl percom open err	Erro de comunicação do <i>hardware</i>	Contactar a CARD	Bip/Impress.
243####	CommCrtl percom send err	Erro de comunicação do <i>hardware</i>	Contactar a CARD	Bip/Impress.
244####	CommCrtl percom rece err	Erro de comunicação do <i>hardware</i>	Contactar a CARD	Bip/Impress.
245####	CommCrtl cmd execution err	Erro de comunicação do <i>hardware</i>	Contactar a CARD	Bip/Impress.
246####	CommCrtl fatal cmd err	Erro de comunicação do <i>hardware</i>	Contactar a CARD	Bip/Impress.
247####	CommCrtl reset occurred	Erro de comunicação do <i>hardware</i>	Contactar a CARD	Bip/Impress.
260	D-cup could not be released	O pegador de D-cup não soltou o D-cup	Manualmente, remover o D-cup apertando a mola do pegador de D-cup Limpar o pegador de D-cup	Bip/Impress.



Código	Condição/ Mensagem	Causa Provável	Ação Corretiva	Sinal
261	D-cup missing	O sensor de D-cup não detectou o D-cup	Verificar: 1- posicionamento da rack de D-cup 2- se há algum D-cup preso no pegador de D-cup 3- estação de lavagem, incubadora, fotômetro e plataforma para ver o posicionamento da rack de D-cup 4- D-cup quanto a algum defeito Reiniciar o sistema para limpeza Contactar a CARD	Bip/Impress.
262	Init detection error	A agulha falhou durante a detecção do poste de iniciação durante a iniciação	Verificar agulha usando procedimentos para agulha molhada ou torta ou falha na verificação da agulha	Bip/Impress.
263	Transfer tip wet or bent	Há ar no sistema	Limpar torre de iniciação Enxugar a agulha Verificar: 1- volume do tampão de lavagem 2- se há bolhas no sistema 3- se as conexões das tubulações estão bem presas Realizar <b>Extended Prime</b>	Bip/Impress.
	Transfer tip wet or bent	A agulha está torta	Verificar: 1- encaixe da agulha 2- se a capa protetora da agulha está posicionado em seu devido lugar 3- se os reagentes e racks de D-cup estão bem posicionados 4- se os reagentes estão bem fechados Trocar agulha	
264	Transfer Tip Check	Agulha está torta	Trocar agulha	Bip/Impress.

Código	Condição/ Mensagem	Causa Provável	Ação Corretiva	Sinal
	Failure			
		Ar em excesso nas tubulações	Realizar <b>Extended Prime</b>	
		O tubo da torre de lavagem está vazio	Confirmar se o nível do tampão de lavagem está < 5 mm abaixo do topo do tubo da torre Verificar se há vazamento na torre ou tubo da torre de lavagem	
278	Level detection statistic warning	A sensibilidade do nível de líquido não está adequada	Verificar: 1- agulha 2- sensores de nível dos galões Realizar <b>Extended Prime</b> Contactar a CARD	Bip/Impress.
309	System master init	Uma novo <i>software</i> (nova versão) foi instalado no sistema O sistema foi "resetado" pressionando o botão <i>reset</i> da CPU 3 vezes	A memória do sistema foi "resetada" Instalar <i>test files, PCR files</i> e os parâmetros de configuração	Bip/Impress.
310	System init	O sistema está iniciando	Nenhuma ação é necessária	Bip/Impress.
318	Close DP cover and TC covers	As tampas dos DPs ou TCs estão abertas	Fechar as tampas	Bip/Tela
319	Startup after diagnostic run	Após Extended Prime e troca de seringa o sistema retorna à sua operação normal	Nenhuma ação é necessária	Tela
331	Wash reservoir low vol	O sensor do reservatório do tampão de lavagem não está detectando líquido	Completar o reservatório do tampão de lavagem Verificar se o sensor está posicionado na altura correta do reservatório	Bip/Impress.
332	Waste container high volume	O sensor do reservatório do esgoto ( <i>waste</i> ) está detectando líquido	Esvaziar o reservatório do esgoto ( <i>waste</i> ) Verificar se o sensor está posicionado na altura correta do reservatório	Bip/Impress.
361	Data base in process try again	O sistema está ocupado	Tente mais tarde	Bip/Impress.
362	Data base mismatch try again	Ocorreu um erro de entrada de dados	Repetir o procedimento	Bip/Impress.

363	More than 210 detections loaded	Foram criadas ordens que requerem mais de 210 D-cups	Apagar ordens de modo que sejam necessários menos de 210 D-cups. Recomeçar a corrida	Bip/Impress.
<b>Código</b>	<b>Condição/Mensagem</b>	<b>Causa Provável</b>	<b>Ação Corretiva</b>	<b>Sinal</b>
364	No test reagent found	Não foi feito o <i>load</i> do reagente em questão	Fazer o <i>load</i> do reagente	Bip/Impress.
365	Load inconsistency: cover open	Uma das tampas dos termocicladores está aberta	Fechar bem as tampas dos termocicladores	Bip/Tela
“	Load inconsistency: (TCA, TCB, DP1 or DP2) order not found	Foi feito o load do A-ring mas a ordem não foi criada	Criar a lista de trabalho do A-ring Fazer o <i>load</i> do A-ring	Bip/Tela
“	Load inconsistency: All tests finished	A lista de trabalho do A-ring está completa	Criar uma nova lista de trabalho para o A-ring	Bip/Tela
“	Load inconsistency: no generic reagent rack in loadlist	Não foi feito o <i>load</i> do nº da rack de reagentes genéricos	Criar uma rack de reagente genéricos Fazer o <i>load</i> da rack de reagentes genéricos	Bip/Tela
“	Load inconsistency: reagent not loaded	Não foi feito o <i>load</i> do nº da rack de reagentes específicos	Criar uma rack de reagentes específicos Fazer o <i>load</i> da rack de reagentes específicos	Bip/Tela
		Não foi feito o <i>load</i> de reagentes específicos necessário para a detecção	Criar uma rack de reagentes específicos Fazer o <i>load</i> da rack de reagentes específicos	
“	Load inconsistency: Sub reagent not loaded	Não foi feito o <i>load</i> do Substrato	Fazer o <i>load</i> de cassetes de Substrato suficientes para a corrida	Bip/Tela
“	Load inconsistency: Con reagent not loaded	Não foi feito o <i>load</i> do Conjugado	Fazer o <i>load</i> de cassetes de Conjugado suficientes para a corrida	Bip/Tela
“	Load inconsistency: DN reagent not loaded	Não foi feito o <i>load</i> da Solução de Desnaturação	Fazer o <i>load</i> de cassetes de Solução de Desnaturação suficientes para a corrida	Bip/Tela
366	Host interface initialized V####	O sistema está iniciando	Nenhuma ação é necessária	Bip/Impress.
367	Check instrument and start	O sistema está se preparando para realizar o <i>loadcheck</i>	Iniciar o <i>loadcheck</i>	Bip/Tela
368	Thermal cycler #### aborted	O sistema abortou a operação de um termociclador	Contactar a CARD	Bip/Impress.
369	Close DP and TC covers and start	Ocorre durante início de operação normal	Fechar as tampas Pressionar <b>START</b>	Bip/Tela

377	No level found reagent pos #####	Nenhum líquido foi encontrado no cassete de reagente da posição #####	Fazer o <i>load</i> de um novo cassete de reagente	Bip/Impress.
<b>Código</b>	<b>Condição/Mensagem</b>	<b>Causa Provável</b>	<b>Ação Corretiva</b>	<b>Sinal</b>
		Erro de sensibilidade quanto ao nível de reagente	Contactar a CARD	
		Presença de ar na agulha	Realizar <b>Extended Prime</b>	
379	Clean up, load empty D-cup rack	O sistema está tentando realizar uma limpeza após um erro de <i>hardware</i>	Colocar uma rack de D-cups vazia Pressionar <b>START</b>	Bip/Tela
380	System in process	A operação solicitada ao sistema não pode ser realizada porque o mesmo está ocupado	Tentar mais tarde	Bip/Tela
381	Printer spooler overload, try again	A operação solicitada ao sistema não pode ser realizada porque o mesmo está ocupado	Tentar mais tarde	Bip/Tela
383	New file	Um novo arquivo foi criado pelo operador	Nenhuma ação é necessária	Bip/Tela
384	File in use	O arquivo requisitado está sendo usado pelo sistema	Tentar mais tarde	Bip/Tela
385	File not found	A procura pelo arquivo não teve sucesso	Entrar com nova procura	Bip/Tela
386	Duplicate file	O nome do arquivo que está sendo criado já existe	Usar outro nome de arquivo	Bip/Tela
387	Data base full	A memória do sistema está cheia	Apagar os resultados	Bip/Tela
389	File in use, modification not saved	O arquivo requisitado está sendo usado pelo sistema	Tentar mais tarde	Bip/Tela
390	File in use, not deleted	O arquivo requisitado está sendo usado pelo sistema	Tentar mais tarde	Bip/Tela
397	Load A-ring into proper location	O A-ring já foi ciclado. Não colocá-lo no TCA ou TCB	Mover o A-ring para o DP1 ou DP2 Pressionar <b>START</b>	Bip/Impress.
398	Run preparation in process	A corrida está sendo iniciada pelo sistema	Nenhuma ação é necessária	Tela
400	Order locked, try later	Uma ordem está em processo	Não tentar modificar ou apagar a ordem	Bip/Tela
401	Cup order locked, try later	Uma ordem está em processo	Não tentar modificar ou apagar a ordem	Bip/Tela
402	Test order locked, try later	Uma ordem está em processo	Não tentar modificar ou apagar a ordem	Bip/Tela
403	New order	Uma nova ordem está	Nenhuma ação é	Bip/Tela

		sendo criada pelo operador	necessária	
404	Order just modified by host	Uma ordem foi modificada pelo <i>host</i> do computador	Nenhuma ação é necessária	Bip/Tela
<b>Código</b>	<b>Condição/Mensagem</b>	<b>Causa Provável</b>	<b>Ação Corretiva</b>	<b>Sinal</b>
405	Order entry error, test #####	Um erro de entrada na ordem ocorreu para o teste designado	Repetir o procedimento	Bip/Tela
406	Delete not allowed, result(s) exist	Não foi aceita a tentativa de apagar os resultados	Rever e aceitar os resultados antes de apagá-los	Bip/Tela
407	Modify not allowed, result(s) exist	Foi feita uma tentativa de modificação de ordem para a qual alguns resultados já haviam sido obtidos	Nenhuma ação é necessária	Bip/Tela
408	No results to selected order	Foi feita uma tentativa para obter resultados que não existem!	Nenhuma ação é necessária	Bip/Tela
409	Order does not exist	Não foi criada ordem para o A-ring designado	Fazer a ordem	Bip/Tela
410	No tests to selected A-tube defined	O teste desejado não foi especificado na ordem do A-ring	Refazer a ordem	Bip/Tela
411	Delete not allowed, TC in process	A ordem está em andamento e não pode ser apagada	Não tentar apagar a ordem	Bip/Tela
412	A-ring has not been cycled	O A-ring não foi ciclado. Não colocá-lo no DP1 ou DP2	Mover o A-ring para TCA ou TCB Pressionar <b>START</b>	Bip/Tela
		O A-ring foi ciclado em outro sistema	Deixar o A-ring no DP1 ou DP2 Pressionar <b>START</b>	
413	System busy – try again	A operação solicitada ao sistema não pode ser realizada porque o mesmo está ocupado	Tentar mais tarde	Bip/Tela
414	Press ESC and then START to clean up	O sistema está tentando realizar uma limpeza após um erro no <i>hardware</i>	Não remover D-cups Pressionar <b>ESCAPE</b> Pressionar <b>START</b>	Bip/Tela
415	Interface check	O sistema está checando a comunicação da interface	Nenhuma ação é necessária	Bip/Tela
416	RAM check	O sistema está verificando o RAM do <i>hardware</i>	Nenhuma ação é necessária	Bip/Tela
417	Photometer check	O sistema está verificando o fotômetro	Nenhuma ação é necessária	Bip/Tela

437	Profile created	O perfil requisitado foi criado	Nenhuma ação é necessária	Tela
438	Run clean up in process	O ensaio foi finalizado e a limpeza está em processo	Nenhuma ação é necessária	Tela
<b>Código</b>	<b>Condição/Mensagem</b>	<b>Causa Provável</b>	<b>Ação Corretiva</b>	<b>Sinal</b>
441	Rack type mismatch	O operador está tentando fazer o <i>load</i> da rack genérica na posição de rack específica ou vice-versa	Fazer o <i>load</i> de rack específica no <i>loc1</i> ou <i>loc2</i> Fazer o <i>load</i> de rack genérica na posição <i>gen</i> da plataforma	Bip/Tela
442	Format error	O dado de identificação do cassette está incorreto	Entrar novamente com a identificação do cassette	Bip/Tela
443	Cassette not unique ####	Está sendo feito o <i>load</i> do mesmo cassette em duas posições diferentes da mesma rack	Fazer apenas uma única vez o <i>load</i> de cada cassette na rack	Bip/Tela
450####	Denaturation successfully	A desnaturação do A-ring indicado foi feita com sucesso	Nenhuma ação é necessária	Bip/Tela
451####	Cycling finished successfully	A ciclagem do A-ring indicado foi feita com sucesso	Nenhuma ação é necessária	Bip/Tela
452####	Cycling finished with TC error	A ciclagem do A-ring indicado foi feita, mas um erro foi detectado	Contactar a CARD	Bip/Tela

418	Printer busy, try later	A operação solicitada ao sistema não pode ser realizada porque o mesmo está ocupado	Tentar mais tarde	Bip/Tela
419	Print message:		Nenhuma ação é necessária	Bip/Tela
<b>Código</b>	<b>Condição/ Mensagem</b>	<b>Causa Provável</b>	<b>Ação Corretiva</b>	<b>Sinal</b>
420	Printer not ready	A operação solicitada ao sistema não pode ser realizada porque a impressora não está preparada	Verificar a impressora Repetir a operação	Bip/Tela
421	Wrong password	O <i>password</i> digitado não está correto	Entrar com o <i>password</i> correto	Bip/Tela
422	Locked, system busy	A operação solicitada ao sistema não pode ser realizada porque o mesmo está ocupado	Tentar mais tarde	Bip/Tela
423	Duplicate number	O nº fornecido ao sistema já existe	Usar novo número	Bip/Tela
426	Transfer aborted, TCs will continue	O operador abortou o funcionamento da agulha (a ciclagem continuará, mas a desnaturação e detecção estão paradas)	Resolver o problema que fez com que a corrida precisasse ser abortada Pressionar <b>START</b> para recomeçar a desnaturação e detecção	Bip/Impress./Tela
427	Turn instrument off	Ocorreu um erro no <i>hardware</i>	Reiniciar o sistema (desligar e ligar o sistema) Ler o que foi impresso para verificar erros adicionais	Bip/Impress./Tela
431	Cassette cover wet reagent pos #####	Durante o <i>loadcheck</i> foi detectado que a tampa do cassete da posição ##### está molhada	Não inverter os cassetes durante a preparação do reagente Remover a tampa do cassete, limpar e posicioná-los novamente no sistema Pressionar <b>START</b>	Bip/Tela
432	User privilege violation	A ação pretendida não é permitida devido ao privilégio de acesso do usuário	Obter assistência de um usuário com um nível maior de acesso	Bip/Tela
435	Profile already exists	Este nº de perfil já existe	Usar uma nova identificação de perfil	Bip/Tela
436	To confirm push <SHIFT><ENTER>	Recurso para confirmar os valores mostrados na tela do sistema	Pressionar <b>&lt;SHIFT&gt;</b> e <b>&lt;ENTER&gt;</b> <b>simultaneamente</b>	Tela

## 9. Contatos com a Roche

Roche Diagnóstica Brasil Ltda.

- Endereço:

Av.Engenheiro Billings, 1729  
Bairro Jaguaré  
São Paulo - SP  
CEP:05321-010

- Suporte ao Cliente:

CARD (Central de Atendimento Roche Diagnóstica)  
Telefone: 0800 7720295  
E-mail: [brasil.card@roche.com](mailto:brasil.card@roche.com)



A CARD foi criada em 2001 com o objetivo de fornecer suporte técnico e científico. Ao entrar em contato com a CARD, o cliente é atendido por uma de nossas receptadoras que, a partir da solicitação feita, registra o chamado no sistema Clarify e o direciona para o especialista apropriado: assistente técnico ou assessor científico. A partir de então, o especialista presta ao cliente todo o suporte necessário que o mesmo necessita.

## 10-Referências bibliográficas

- Bula do kit Cobas Amplicor HIV-1 Monitor v1.5.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., et al. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**:335-350.
- Myers, T.W., and Gelfand, D.H. 1991. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* Dna polymerase. *Biochemistry* **30**:7661-7666.
- Longo, M.C., Berninger, M.S., Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**:125-128.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)