

Manuale del kit *artus*[®] HI Virus-1 QS- RGQ



24 (cat. n. 4513363)



72 (cat. n. 4513366)

Versione 1

IVD

Diagnostica quantitativa in vitro

Per l'uso con gli strumenti QIASymphony[®] SP/AS e Rotor-Gene[®] Q



REF

4513363, 4513366



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R5

MAT

1060923IT



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN è un fornitore leader nel settore delle tecnologie innovative per campioni e test che consentono di isolare e rilevare il contenuto di qualunque campione biologico. I nostri prodotti e i nostri servizi di alta qualità sono una garanzia di successo, dall'analisi del campione al risultato.

QIAGEN pone nuovi standard:

- nella purificazione del DNA, RNA e delle proteine
- nell'analisi di acidi nucleici e proteine
- nella ricerca sul microRNA e sull'RNAi
- nelle tecnologie automatizzate per campioni e analisi

Il nostro obiettivo è il vostro successo. Per ulteriori informazioni, visitate il sito www.qiagen.com.

Indice

Uso previsto	4
Sommario e spiegazioni	4
Informazioni sull'agente patogeno	5
Materiali in dotazione	7
Contenuto del kit	7
Materiali necessari ma non in dotazione	8
Avvertenze e precauzioni	8
Precauzioni generali	9
Conservazione e manipolazione dei reagenti	9
Conservazione e manipolazione dei campioni	10
Procedura	11
Preparazione degli strumenti QIA Symphony SP/AS	11
Purificazione dell'RNA virale	11
Utilizzo di un controllo interno e del carrier RNA (CARRIER)	11
Set di controllo del test e set di parametri del test	11
Rese degli acidi nucleici	12
Conservazione degli acidi nucleici	12
Protocollo: Isolamento dell'RNA e setup del test sugli strumenti QIA Symphony SP/AS	13
Protocollo: RT-PCR sul Rotor-Gene Q	18
Interpretazione dei risultati	19
Guida alla risoluzione dei problemi	19
Controllo di qualità	25
Limiti della metodica	25
Caratteristiche delle prestazioni	25
Riferimenti citati	25
Simboli	26
Informazioni sui contatti	26
Informazioni per gli ordini	27

Uso previsto

Il kit *artus* HI Virus-1 QS-RGQ è un test in vitro per l'amplificazione degli acidi nucleici utilizzato per quantificare l'RNA del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1) in campioni biologici umani. Questo test diagnostico utilizza la reazione a catena della polimerasi dopo trascrittasi inversa (RT-PCR) ed è configurato per essere utilizzato con gli strumenti QIA Symphony SP/AS e Rotor-Gene Q. È stato convalidato l'uso nel test di campioni contenenti i sottotipi A-H del gruppo M.

Il kit *artus* HI Virus-1 QS-RGQ deve essere utilizzato insieme a indicatori di presentazioni cliniche e altri indicatori di laboratorio nella prognosi delle malattie e come strumento ausiliario di valutazione della risposta virale alla terapia antiretrovirale misurata dai cambiamenti nei livelli di RNA dell'HIV-1 nel plasma umano con EDTA. Il kit *artus* HI Virus-1 QS-RGQ non deve essere utilizzato come test di screening dell'HIV o come test diagnostico per confermare la presenza di un'infezione da HIV.



Per maggiori informazioni sui campioni biologici umani con cui è stato convalidato il kit, consultare le Schede di Applicazione disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/products/artushivirusrtpcrkitce.aspx.

QIAGEN tiene sotto costante monitoraggio le prestazioni del test e convalida nuove rivendicazioni, pertanto si chiede agli utenti di assicurarsi di operare sempre con la revisione più recente delle istruzioni per l'uso.



Prima di eseguire il test verificare la disponibilità di nuove revisioni delle etichette elettroniche nel sito www.qiagen.com/products/artushivirusrtpcrkitce.aspx.

Tutti i kit possono essere utilizzati con le rispettive istruzioni purché il numero di versione del manuale e le altre informazioni riportate sulle etichette corrispondano al numero di versione del kit. Il numero di versione è visibile su ogni etichetta della scatola del kit. QIAGEN assicura la compatibilità tra tutti i lotti dei kit dei test che riportano lo stesso numero di versione.

Sommario e spiegazioni

Il kit *artus* HI Virus-1 QS-RGQ è un sistema pronto all'uso per il rilevamento dell'RNA dell'HIV-1 tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) su strumenti Rotor-Gene Q con preparazione dei campioni e setup del test eseguiti su strumenti QIA Symphony SP/AS. L'HI Virus-1 RG Master A e B contengono reagenti ed enzimi per la trascrittasi inversa e l'amplificazione specifica di una

regione da 93 bp del genoma dell'HIV-1 e per il rilevamento diretto dell'amplicone specifico nel canale di fluorescenza Cycling Green (Ciclo verde) del Rotor-Gene Q.

Il kit *artus* HI Virus-1 QS-RGQ contiene anche un secondo sistema di amplificazione eterologo per il rilevamento di una possibile inibizione della PCR. Questa viene rilevata come controllo interno (IC) nel canale di fluorescenza Cycling Orange (Ciclo arancione) del Rotor-Gene Q. Tale controllo non riduce il limite di rilevabilità della RT-PCR analitica dell'HI Virus-1. Il kit contiene controlli positivi esterni (HI Virus-1 RG QS 1–4) che consentono di determinare la quantità di RNA virale. Per maggiori informazioni consultare la corrispondente Scheda di Applicazione all'indirizzo www.qiagen.com/products/artushivirusrt-pcrkitce.aspx.

Informazioni sull'agente patogeno

Il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) è un retrovirus che causa la sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). Esistono due tipi di HIV responsabili delle infezioni nell'uomo, HIV-1 e HIV-2, caratterizzati da virulenza e prevalenza diverse. Gran parte dei casi di AIDS documentati a livello mondiale sono stati attribuiti all'HIV-1. L'infezione da HIV si verifica per trasferimento di sangue infetto, liquido vaginale, latte materno e altri fluidi corporei. L'HIV è presente in questi fluidi sia sotto forma di particelle virali libere che all'interno di cellule immuni infette. I tre principali veicoli di trasmissione sono i rapporti sessuali non protetti, l'uso di aghi contaminati e la trasmissione da madre infetta a figlio alla nascita o tramite latte materno.

L'HIV infetta principalmente le cellule del sistema immunitario umano, quali le cellule T helper (in particolare CD4⁺). L'infezione da HIV causa ridotti livelli di cellule T CD4⁺. Quando la quantità di cellule T CD4⁺ scende al di sotto del livello di guardia, l'immunità cellulo-mediata viene meno e l'organismo diventa sempre più suscettibile alle infezioni opportunistiche.

I sintomi dell'AIDS si manifestano in una fase avanzata dell'infezione da HIV, quando il sistema immunitario compromesso non è in grado di contrastare le infezioni opportunistiche. In questa fase, il soggetto infetto sviluppa in maniera progressiva i sintomi innescati da tali infezioni. Le infezioni più comuni sono diarrea cronica da criptosporidiosi, infezioni oculari indotte dal citomegalovirus, polmonite pneumocistica, toxoplasmosi e tubercolosi, oltre alle infezioni causate da componenti del complesso *Mycobacterium avium*. Viene inoltre osservato frequentemente lo sviluppo di diversi tipi di tumori, quali tumore cervicale invasivo, sarcoma di Kaposi o linfoma. Attualmente non esistono cure per l'AIDS e si ritiene che gran parte dei soggetti affetti da HIV sia

destinata al decesso causato da una delle malattie correlate al virus. Tuttavia, grazie ai progressi raggiunti nella messa a punto di terapie contro l'HIV/AIDS, comprese sia quelle che mirano a contrastare il virus che quelle che tentano di prevenire o trattare le infezioni opportunistiche, si è registrato un netto miglioramento nell'aspettativa e nella qualità di vita di molti pazienti affetti da HIV/AIDS. (1-4)

Materiali in dotazione

Contenuto del kit

artus HI Virus-1 QS-RGQ Kit		(24)	(72)
N° di catalogo		4513363	4513366
N° di reazioni		24	72
Blu	HI Virus-1 RG Master A (master A per HI Virus-1 RG)	4 x 144 µl	8 x 144 µl
Viola	HI Virus-1 RG Master B (master B per HI Virus-1 RG)	4 x 216 µl	8 x 216 µl
Rosso	HI Virus-1 RG QS 1* (1x 10 ⁴ UI/µl)	QS 200 µl	200 µl
Rosso	HI Virus-1 RG QS 2* (1x 10 ³ UI/µl)	QS 200 µl	200 µl
Rosso	HI Virus-1 RG QS 3* (1x 10 ² UI/µl)	QS 200 µl	200 µl
Rosso	HI Virus-1 RG QS 4* (1x 10 ¹ UI/µl)	QS 200 µl	200 µl
Verde	HI Virus-1 RG IC [†] (controllo interno per HI Virus-1 RG)	IC 1.000 µl	2 x 1.000 µl
Bianco	Acqua (PCR-grade)	1.000 µl	1.000 µl
	<i>artus HI Virus-1 QS-RGQ Kit Handbook (manuale del kit artus HI Virus-1 QS-RGQ) (inglese)</i>	1	1

* Standard di quantificazione.

† Controllo interno.

Materiali necessari ma non in dotazione

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le rispettive schede tecniche di sicurezza (SDS), reperibili presso il fornitore.

- Pipette (regolabili)* e puntali per pipetta sterili con filtri
- Agitatore vortex*
- Centrifuga da banco* con rotore per provette di reazione da 2 ml, per centrifugazione a 6.800 x g

Per la preparazione dei campioni

- QIASymphony SP instrument (Strumento QIASymphony SP) (cat. n. 9001297)*
- QIASymphony AS instrument (Strumento QIASymphony AS) (cat. n. 9001301)*

Per PCR

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM*†
- Software Rotor-Gene Q versione 2.1 o superiore
- Facoltativo: Rotor-Gene AssayManager versione 1.0 o superiore

Nota: Per ulteriori informazioni sui materiali necessari per applicazioni specifiche, consultare la corrispondente Scheda di Applicazione disponibile all'indirizzo www.qiagen.com/products/artushivirusrt-pcrkitce.aspx.

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per ulteriori informazioni, consultare le appropriate schede tecniche di sicurezza (SDS). Le schede SDS, nel pratico e compatto formato PDF, sono disponibili online all'indirizzo

* Assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati secondo le raccomandazioni del produttore.

† Se applicabile, strumento Rotor-Gene Q 5plex HRM con data di produzione pari o successiva a gennaio 2010. La data di produzione può essere ricavata dal numero di serie sul retro dello strumento. Il numero di serie è nel formato "mmaann", dove "mm" sta per il mese di produzione in cifre, "aa" per le ultime due cifre dell'anno di produzione e "nnn" per l'identificatore univoco dello strumento.

www.qiagen.com/safety. Qui è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN® e i relativi componenti.

Per le informazioni sulla sicurezza riguardanti il kit di purificazione utilizzato, consultare il manuale del relativo kit. Per le informazioni antinfortunistiche riguardanti gli strumenti, fare riferimento al manuale del relativo strumento.

Smaltire i campioni e i residui dei test secondo le locali disposizioni in materia di sicurezza.

Precauzioni generali

Attenersi sempre a quanto segue:

- Utilizzare puntali con filtro sterili per pipette.
- Durante le operazioni manuali, tenere chiuse le provette il più possibile ed evitare ogni contaminazione.
- Prima dell'inizio del test scongelare tutti i componenti a temperatura ambiente (15-25°C).
- Una volta scongelati, miscelare i componenti (pipettandoli ripetutamente su e giù o in vortex a impulsi) e sottoporli a breve centrifugazione. Verificare che nelle provette dei reagenti non siano presenti bolle o schiuma.
- Non miscelare i componenti di kit con numero di lotto diverso.
- Accertarsi che gli adattatori necessari siano stati preraffreddati a 2–8°C.
- Prima del caricamento, operare rapidamente tenendo i reagenti per PCR in ghiaccio o nel blocco di raffreddamento.
- Passare senza interruzioni da una fase all'altra del flusso di lavoro. Il tempo di trasferimento da un modulo all'altro (da QIASymphony SP a QIASymphony AS, a Rotor-Gene Q) non deve superare i 30 minuti.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

I componenti del kit *artus* HI Virus-1 QS-RGQ devono essere conservati ad una temperatura compresa tra -15 e -30°C e sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Evitare scongelamenti e congelamenti ripetuti (più di due volte), perché ciò potrebbe ridurre le prestazioni del test.

Conservazione e manipolazione dei campioni

Per informazioni sulla conservazione e manipolazione dei campioni per applicazioni specifiche, consultare la corrispondente Scheda di Applicazione disponibile all'indirizzo www.qiagen.com/products/artushivirusrt-pcrkitce.aspx.

Procedura

Preparazione degli strumenti QIASymphony SP/AS

Chiudere tutti i cassettei e i coperchi.

Accendere gli strumenti QIASymphony SP/AS e attendere la visualizzazione della schermata "Sample Preparation" (Preparazione campioni) e la fine della procedura di inizializzazione.

Registrarsi nello strumento (i cassettei si sbloccano).

Purificazione dell'RNA virale

Il kit *artus* HI Virus-1 QS-RGQ è stato convalidato con una fase di purificazione dell'RNA virale eseguita sullo strumento QIASymphony SP con un kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen. Consultare il manuale QIASymphony DSP Virus/Pathogen (*QIASymphony DSP Virus/Pathogen Handbook*) contenente tutte le informazioni sulla procedura di preparazione della cartuccia reagenti per la fase di purificazione dei campioni sul QIASymphony SP.

Utilizzo di un controllo interno e del carrier RNA (CARRIER)

L'utilizzo dei kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen in combinazione con il kit *artus* HI Virus-1 QS-RGQ richiede l'aggiunta del controllo interno (HI Virus-1 RG IC) nella procedura di purificazione per monitorare l'efficienza della preparazione dei campioni e del test a valle. Inoltre, i kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen possono richiedere la preparazione del carrier RNA (CARRIER). Per informazioni specifiche riguardanti il controllo interno e l'uso del carrier RNA (CARRIER), consultare la corrispondente Scheda di Applicazione disponibile all'indirizzo www.qiagen.com/products/artushivirusrtpcrkitce.aspx.

Set di controllo del test e set di parametri del test

I set di controllo del test combinano un protocollo con alcuni parametri aggiuntivi, quali un controllo interno, per la purificazione dei campioni sul QIASymphony SP. Un set di controllo del test predefinito è preinstallato per ogni protocollo.

I Set di Parametri del Test combinano una definizione del test con alcuni parametri aggiuntivi definiti, quali conteggio dei replicati e numero degli standard del test, per il setup del test sul QIASymphony AS.

Per i processi integrati sugli strumenti QIA Symphony SP/AS, il set di parametri del test è direttamente collegato a un set di controllo del test iniziale, che specifica il processo associato di purificazione dei campioni.

Rese degli acidi nucleici

Gli eluiti preparati con carrier RNA (CARRIER) possono contenere molto più carrier RNA (CARRIER) degli acidi nucleici bersaglio. Si consiglia di utilizzare metodi di amplificazione quantitativa per stabilire le rese.

Conservazione degli acidi nucleici

Per la conservazione a breve termine fino ad un massimo di 24 ore, si consiglia di conservare gli acidi nucleici purificati a 2–8°C, mentre per la conservazione a lungo termine di oltre 24 ore si consiglia una conservazione a –20°C.

Protocollo: Isolamento dell'RNA e setup del test sugli strumenti QIASymphony SP/AS

Si illustra di seguito un protocollo generale per l'impiego dei kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen. Per informazioni dettagliate relative ad una specifica applicazione, ad esempio volumi e provette, consultare la corrispondente Scheda di Applicazione disponibile all'indirizzo www.qiagen.com/products/artushivirusrt-pcrkitce.aspx.

Punti importanti prima di iniziare

- Acquisire esperienza con l'uso degli strumenti QIASymphony SP/AS. Per le istruzioni di funzionamento consultare i manuali utente allegati agli strumenti, le cui versioni più aggiornate sono disponibili online nel sito www.qiagen.com/products/qiasymphonyrgq.aspx.
- Prima di utilizzare una cartuccia reagenti (RC) per la prima volta, controllare che i tamponi QSL2 e QSB1 nella cartuccia (RC) non contengano un precipitato. Se necessario, rimuovere i recipienti contenenti i tamponi QSL2 e QSB1 dalla cartuccia reagenti (RC) e incubarli per 30 minuti a 37°C agitandoli di tanto in tanto per sciogliere il precipitato. Accertarsi di riposizionare correttamente i recipienti. Se la cartuccia reagenti (RC) è già stata perforata, accertarsi che i recipienti vengano sigillati con le Strisce Sigillanti Riutilizzabili, quindi incubare l'intera cartuccia reagenti (RC) per 30 minuti a 37°C agitando di tanto in tanto in un bagnomaria.*
- Evitare di agitare energicamente la cartuccia reagenti (RC) per prevenire la formazione di schiuma che potrebbe compromettere il rilevamento del livello del liquido.
- Prima del caricamento, operare rapidamente tenendo i reagenti per PCR in ghiaccio o nel blocco di raffreddamento.
- I volumi di reagente sono ottimizzati per 24 o 72 reazioni per kit per processo (cat. n. 4513363 e 4513366, rispettivamente).
- Prima di ogni utilizzo, tutti i reagenti devono essere scongelati completamente, miscelati (pipettandoli ripetutamente su e giù o su vortex rapido) e centrifugati per almeno 3 secondi a 6.800 x g. Evitare la formazione di schiuma nei reagenti.

* Assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati periodicamente secondo le disposizioni del produttore.

- È stata osservata la stabilità degli eluiti ottenuti dalla preparazione dei campioni e di tutti i componenti del kit *artus* HI Virus-1 QS-RGQ a bordo dello strumento per un tempo pari ad almeno il tempo normalmente richiesto per la purificazione di 96 campioni e il setup di 72 test, compreso un tempo di trasferimento massimo di 30 minuti dal QIASymphony SP al QIASymphony AS e di 30 minuti dal QIASymphony AS al Rotor-Gene Q.

Prima di iniziare

- Preparare tutte le miscele necessarie. Se necessario, preparare le miscele contenenti il carrier RNA (CARRIER) e i controlli interni subito prima di iniziare. Per maggiori informazioni consultare la corrispondente Scheda di Applicazione disponibile all'indirizzo www.qiagen.com/products/artushivirusrt-pcrkitce.aspx.
- Prima di avviare la procedura, accertarsi che le particelle magnetiche siano completamente risospese. Agitare vigorosamente su vortex il recipiente contenente le particelle magnetiche per almeno 3 minuti prima del primo utilizzo.
- Prima di caricare la cartuccia reagenti (RC), rimuovere il coperchio dal recipiente contenente le particelle magnetiche e aprire le provette dell'enzima. Accertarsi che il rack dell'enzima sia stato temostatato a temperatura ambiente (15–25°C).
- Accertarsi che il coperchio perforante (PL) venga collocato sulla cartuccia reagenti (RC) e che il coperchio del recipiente delle particelle magnetiche venga rimosso oppure, se si utilizza una cartuccia reagenti già parzialmente utilizzata (RC), accertarsi che le Strisce Sigillanti Riutilizzabili siano state rimosse.
- Se i campioni sono provvisti di codici a barre, orientare i campioni nel portaprovette in modo che i codici a barre siano rivolti verso il corrispondente lettore dentro il cassetto "Sample" (Campione) sul lato sinistro dello strumento QIASymphony SP.

Procedura

Purificazione dell'RNA virale sul QIA Symphony SP

1. **Chiudere tutti i cassettei e i coperchi degli strumenti QIA Symphony SP/AS.**
2. **Accendere gli strumenti e attendere la visualizzazione della schermata "Sample Preparation" e la fine della procedura di inizializzazione.**

L'interruttore di alimentazione è collocato nell'angolo inferiore sinistro dello strumento.

3. **Eeguire il login negli strumenti.**
4. **Preparare i seguenti cassettei secondo la corrispondente Scheda di Applicazione disponibile all'indirizzo www.qiagen.com/products/artushivirusrt-pcrkitce.aspx.**
 - Cassetto "Waste" (Materiali di scarto); dopo la relativa preparazione, eseguire una scansione di inventario.
 - Cassetto "Eluate" (Eluito); dopo la relativa preparazione, eseguire una scansione di inventario.
 - Cassetto "Reagents and Consumables" (Reagenti e materiali di consumo); dopo la relativa preparazione, eseguire una scansione di inventario.
 - Cassetto "Sample"
5. **Utilizzando il setup "Integrated run" (Processo integrato) sul touch screen del QIA Symphony, inserire le informazioni necessarie per ogni lotto di campioni da processare. Selezionare il set di parametri del test per il processo, quindi assegnare lo stesso e il corrispondente lotto AS ai campioni.**

Per informazioni sul set di parametri del test e sul volume di eluizione preselezionato, consultare la corrispondente Scheda di Applicazione.

Per maggiori informazioni sui processi integrati sugli strumenti QIA Symphony SP/AS, consultare i rispettivi manuali utente.
6. **Quando si configura un processo integrato, verificare la corretta assegnazione del materiale da laboratorio per campioni, del tipo di campione (campione, EC+ e EC-) e dei rispettivi volumi.**

Per informazioni sui materiali di consumo e i componenti da caricare in ogni cassetto consultare la corrispondente Scheda di Applicazione.
7. **Dopo aver inserito tutte le informazioni su tutti i lotti del processo integrato, cliccare sul pulsante "Ok" per uscire dal setup "Integrated run". Lo stato di tutti i lotti nella panoramica del processo integrato passa da "LOADED" (Caricato) a "QUEUED" (In coda). Non appena un lotto viene messo in coda,**

appare il pulsante "Run" (Esegui). Premere il pulsante "Run" per avviare la procedura.

Tutte le fasi di processazione sono completamente automatizzate.

Caricamento dei cassettei del QIASymphony AS per il setup del test

- 8. Dopo aver messo in coda un processo integrato, aprire i cassettei del QIASymphony AS. I componenti necessari da caricare sono visualizzati sul touch screen.**
- 9. Accertarsi di eseguire sempre le seguenti operazioni prima di passare al processo integrato.**
 - Inserire lo scivolo dei puntali.
 - Eliminare il sacchetto per lo smaltimento dei puntali.
 - Installare un sacchetto vuoto per lo smaltimento dei puntali.
- 10. Definire e caricare il/i rack per test. Il/i rack per test, collocato/i su adattatore/i preraffreddato/i, è/sono caricato/i nella/e apertura/e "Assay" (Test). Per informazioni sui rack per test consultare la corrispondente Scheda di Applicazione disponibile all'indirizzo www.qiagen.com/products/artushivirusrt-pcrkitce.aspx.**
- 11. Controllare la temperatura delle posizioni di raffreddamento.**

Raggiunte le temperature target di raffreddamento, i piccoli asterischi accanto ad ogni apertura sono visualizzati in verde.
- 12. Riunire tutte le provette di HI Virus-1 RG Master A di un kit in un'unica provetta prima dell'uso. Riunire tutte le provette di HI Virus-1 RG Master B di un kit in un'unica provetta prima dell'uso.**

Nota: I reagenti viscosi possono essere difficili da manipolare con pipette manuali. Accertarsi di trasferire l'intero volume di Master nella provetta.
- 13. Riempire ogni provetta per reagente con il volume necessario del rispettivo reagente secondo i dati di carico forniti dal software dello strumento.**

Nota: Prima di ogni utilizzo, tutti i reagenti devono essere scongelati completamente, miscelati (pipettandoli ripetutamente su e giù o su vortex rapido) e centrifugati per almeno 3 s a 6.800 x g. Evitare la formazione di bolle o schiuma che potrebbe causare errori di analisi. Prima del caricamento, operare rapidamente tenendo i componenti per PCR in ghiaccio o nel blocco di raffreddamento.
- 14. Caricare il rack per reagenti e collocare le provette per reagenti, senza coperchi, nelle rispettive posizioni degli adattatori preraffreddati per reagenti secondo la corrispondente Scheda di Applicazione.**

15. **Caricare i puntali con filtro monouso nei cassettei "Eluate and Reagents" (Eluito e reagenti) e "Assays" (Test) in base al numero necessario di ogni tipo di puntale indicato nella corrispondente Scheda di Applicazione.**
16. **Chiudere i cassettei "Eluate and Reagents" e "Assays".**
17. **Alla chiusura di ciascun cassetto, premere "Scan" (Scansiona) per avviare la scansione di inventario per ogni cassetto.**

La scansione di inventario controlla le aperture, gli adattatori, i puntali con filtro e lo scivolo dei puntali, nonché il corretto caricamento dei volumi specifici dei reagenti. Se necessario, correggere eventuali errori.

Il setup del test si avvia automaticamente dopo che la fase di purificazione sul QIASymphony SP è stata completata e i rack per eluizione sono stati trasferiti nel QIASymphony AS.

18. **Finita l'analisi, premere "Remove" (Rimuovi) nella schermata "Overview" (Panoramica) del setup del test. Aprire il cassetto "Assays" e scaricare i rack.**
19. **Scaricare i file dei risultati e del termociclatore.**
20. **Se sul QIASymphony AS sono configurati più lotti in un processo integrato, ricaricare i cassettei del QIASymphony AS partendo dal punto 8.**
21. **Passare a "Protocollo: RT-PCR sul Rotor-Gene Q", pag. 18.**
22. **Eeguire regolarmente la manutenzione del QIASymphony AS durante la PCR sul Rotor-Gene Q o successivamente.**

Essendo previsto un funzionamento integrato, pulire tutti gli strumenti alla fine dell'intero flusso di lavoro.

Seguire le istruzioni per la manutenzione contenute nel manuale utente QIASymphony SP/AS — descrizione generale (*QIASymphony SP/AS User Manual — General Description*). Eeguire regolarmente la manutenzione per minimizzare il rischio di cross-contaminazione.

Protocollo: RT-PCR sul Rotor-Gene Q

Punti importanti prima di iniziare

- Dedicare il tempo necessario alla familiarizzazione con il Rotor-Gene Q prima di avviare il protocollo. Fare riferimento al manuale utente dello strumento.
- Per l'interpretazione automatica dei risultati della PCR si può utilizzare il Rotor-Gene AssayManager al posto del software del Rotor-Gene Q.
- Accertarsi che in ogni PCR siano inclusi tutti i 4 standard di quantificazione e almeno un controllo negativo (acqua, PCR-grade). Per generare una curva standard, utilizzare tutti i 4 standard di quantificazione forniti (HI Virus-1 QS 1–4) per ogni PCR.

Procedura

1. **Chiudere le provette per PCR e collocarle nel rotore a 72 pozzetti del Rotor-Gene Q. Verificare che le provette per 4 strisce Rotor-Gene Q vengano trasferite con il giusto orientamento, in modo da far coincidere gli indici di posizione dell'adattatore di raffreddamento e del rotore. Verificare che l'anello di bloccaggio (accessorio dello strumento Rotor-Gene) sia presente sopra il rotore per evitare l'apertura accidentale delle provette durante l'analisi.**
2. **Trasferire il file del termociclatore dal QIASymphony AS al computer del Rotor-Gene Q.**
3. **Per il rilevamento dell'RNA dell'HIV-1 creare un profilo termico e avviare il processo secondo la corrispondente Scheda di Applicazione disponibile all'indirizzo www.qiagen.com/products/artushivirusrtpcrkitce.aspx. Per informazioni specifiche del software riguardanti la programmazione del Rotor-Gene Q consultare la corrispondente Scheda del Protocollo "Settings to run *artus* QS-RGQ Kits" (Impostazioni per processare i kit *artus* QS-RGQ) disponibile all'indirizzo www.qiagen.com/products/artushivirusrtpcrkitce.aspx.**

Interpretazione dei risultati

Per maggiori informazioni sull'interpretazione dei risultati consultare la corrispondente Scheda di Applicazione disponibile all'indirizzo www.qiagen.com/products/artushivirusrt-pcrkitce.aspx.

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per chiarire eventuali dubbi che possano presentarsi. Gli esperti del servizio di assistenza tecnica di QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante informazioni e protocolli presentati in questo manuale o le tecnologie per campioni e analisi (per le informazioni sui contatti vedere il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Commenti e suggerimenti

Gestione generale

Messaggio d'errore visualizzato sul touch screen	Se durante l'esecuzione di un protocollo viene visualizzato un messaggio d'errore, consultare i manuali forniti con gli strumenti.
--	--

Precipitato nel recipiente del reagente della cartuccia aperta del kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen

a) Evaporazione del tampone	Un'eccessiva evaporazione può causare un aumento della concentrazione di sali o una riduzione della concentrazione di alcol nei tamponi. Eliminare la cartuccia reagenti (RC). Accertarsi di sigillare i recipienti dei tamponi di una cartuccia reagenti (RC) utilizzata solo parzialmente con le strisce sigillanti riutilizzabili se i tamponi non vengono utilizzati per la purificazione.
-----------------------------	--

Commenti e suggerimenti

- b) Conservazione della cartuccia reagenti (RC) La conservazione della cartuccia reagenti (RC) ad una temperatura inferiore ai 15°C può provocare la formazione di precipitati. Se necessario, rimuovere i recipienti contenenti i tamponi QSL2 e QSB1 dalla cartuccia reagenti (RC) e incubarli in un bagnomaria* per 30 minuti a 37°C agitandoli di tanto in tanto per sciogliere il precipitato. Accertarsi di riposizionare correttamente i recipienti. Se la cartuccia reagenti (RC) è già stata perforata, accertarsi che i recipienti vengano sigillati con le strisce sigillanti riutilizzabili, quindi incubare l'intera cartuccia reagenti (RC) in un bagnomaria* per 30 minuti a 37°C agitando di tanto in tanto.

Bassa resa di acidi nucleici

- a) Particelle magnetiche non risospese completamente Prima di avviare la procedura, accertarsi che le particelle magnetiche siano completamente risospese. Agitare su vortex per almeno 3 minuti prima dell'uso.
- b) Campioni congelati non miscelati correttamente dopo lo scongelamento Scongellare i campioni con una leggera agitazione per garantirne un'accurata miscelazione.
- c) Carrier RNA (CARRIER) non aggiunto Ricostituire il carrier RNA (CARRIER) nel tampone AVE (AVE) e miscelare con un volume adeguato di tampone AVE (AVE) come descritto nella corrispondente Scheda di Applicazione disponibile all'indirizzo www.qiagen.com/products/artushivirusrtpcrkitce.aspx. Ripetere il processo di purificazione con nuovi campioni.

* Assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati periodicamente secondo le disposizioni del produttore.

Commenti e suggerimenti

- d) Acidi nucleici degradati
I campioni sono stati conservati in modo errato oppure soggetti a troppi cicli di congelamento-scongelo. Ripetere il processo di purificazione con nuovi campioni.
- e) Lisi dei campioni incompleta
Prima dell'uso verificare che i tamponi QSL2 e QSB1 non contengano precipitati. Se necessario, rimuovere i recipienti contenenti i tamponi QSL1 e QSB1 dalla cartuccia reagenti (RC) e incubarli per 30 minuti a 37°C agitandoli di tanto in tanto per sciogliere il precipitato. Se la cartuccia reagenti (RC) è già stata perforata, accertarsi che i recipienti vengano sigillati con le Strisce Sigillanti Riutilizzabili, quindi incubare l'intera cartuccia reagenti (RC) per 30 minuti a 37°C agitando di tanto in tanto in un bagnomaria.*
- f) Ostruzione del puntale per pipetta a causa di materiale insolubile
Il materiale insolubile non è stato rimosso dal campione prima di avviare la procedura di purificazione QIA Symphony. Per rimuovere il materiale insolubile per applicazioni virali, centrifugare il campione a 3.000 x g per 1 minuto, quindi trasferire il supernatante in una nuova provetta.

* Assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati periodicamente secondo le disposizioni del produttore.

Commenti e suggerimenti

QIAsymphony AS rileva una quantità insufficiente di master

Non tutto il Master trasferito nella provetta

Riunire tutte le provette di HI Virus-1 RG Master A di un kit in un'unica provetta prima dell'uso.

Riunire tutte le provette di HI Virus-1 RG Master B di un kit in un'unica provetta prima dell'uso. I reagenti viscosi possono essere difficili da manipolare con pipette manuali. Accertarsi di trasferire l'intero volume di Master nella provetta.

Per i reagenti viscosi si consiglia di aspirare un volume extra del 5% quando si utilizzano pipette manuali (ad es. regolare la pipetta a 840 µl per un volume di 800 µl).

In alternativa, dopo aver lentamente dispensato il liquido ed effettuato un blow-out sulla parete della provetta target, rimuovere il puntale dal liquido, rilasciare lo stantuffo della pipetta e attendere altri 10 secondi. Il liquido residuo scenderà dal puntale e, a questo punto, si potrà effettuare il blow-out premendo una seconda volta lo stantuffo della pipetta. L'impiego di puntali con filtro per PCR "low retention" può migliorare il recupero del liquido.

Non viene rilevato nessun segnale con controlli positivi (HI Virus-1 RG QS 1-4) nel canale di fluorescenza Cycling Green

a) Il canale di fluorescenza selezionato per l'analisi dei dati PCR non è conforme al protocollo

Per l'analisi dei dati selezionare il canale di fluorescenza Cycling Green per la PCR analitica dell'HI Virus-1 e il canale di fluorescenza Cycling Orange per la PCR del controllo interno.

b) Programmazione non corretta del profilo termico dello strumento Rotor-Gene

Confrontare il profilo termico con il protocollo. Consultare la corrispondente Scheda di Applicazione e la Scheda del Protocollo disponibili all'indirizzo www.qiagen.com/products/artushivirusrt-pcrkitce.aspx.

Commenti e suggerimenti

- c) Configurazione non corretta della PCR
Verificare che il setup del test sia stato eseguito correttamente e che sia stato usato il set corretto di parametri del test. Ripetere la reazione di PCR, se necessario. Consultare la corrispondente Scheda di Applicazione disponibile all'indirizzo www.qiagen.com/products/artushivirusrt-pcrkitce.aspx.
- d) Le condizioni di conservazione per uno o più componenti del kit non corrispondevano alle istruzioni fornite in "Conservazione e manipolazione dei reagenti" (pag. 9)
Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza dei reagenti (vedere etichetta del kit) e utilizzare un nuovo kit se necessario.
- e) Il kit *artus* HI Virus-1 QS-RGQ è scaduto
Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza dei reagenti (vedere etichetta del kit) e utilizzare un nuovo kit se necessario.

Segnale debole o assente del controllo interno di un campione di plasma negativo sottoposto a purificazione con il kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen nel canale di fluorescenza Cycling Orange e assenza simultanea di segnale nel canale Cycling Green

- a) Le condizioni della PCR non sono conformi al protocollo
Verificare le condizioni della PCR (vedere sopra) e ripetere la PCR con impostazioni corrette, se necessario.
- b) La PCR è stata inibita
Verificare che sia stato usato il metodo di isolamento convalidato (vedere "Protocollo: Isolamento dell'RNA e setup del test sugli strumenti QIASymphony SP/AS", pag. 13) e seguire scrupolosamente le istruzioni.

Commenti e suggerimenti

- c) RNA perso durante l'estrazione
L'assenza di segnale del controllo interno può indicare la perdita di RNA durante l'estrazione. Verificare che sia stato usato il metodo di isolamento convalidato (vedere "Protocollo: Isolamento dell'RNA e setup del test sugli strumenti QIA Symphony SP/AS", pag. 13) e seguire scrupolosamente le istruzioni.
Vedere anche "Bassa resa degli acidi nucleici" sopra.
- d) Le condizioni di conservazione per uno o più componenti del kit non corrispondevano alle istruzioni fornite in "Conservazione e manipolazione dei reagenti" (pag. 9)
Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza dei reagenti (vedere etichetta del kit) e utilizzare un nuovo kit se necessario.
- e) Il kit *artus* HI Virus-1 QS-RGQ è scaduto
Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza dei reagenti (vedere etichetta del kit) e utilizzare un nuovo kit se necessario.

Segnali con i controlli negativi nel canale di fluorescenza Cycling Green della PCR analitica

- a) Si è verificata una contaminazione durante la preparazione della PCR
Ripetere la PCR con nuovi reagenti in replicati.
Se possibile, chiudere le provette PCR subito dopo l'immissione del campione da testare.
Verificare che l'area di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a intervalli regolari.
- b) Si è verificata una contaminazione durante l'estrazione
Ripetere l'estrazione e la PCR del campione da testare utilizzando nuovi reagenti.
Verificare che l'area di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a intervalli regolari.

Controllo di qualità

In conformità con il sistema di gestione per la qualità di QIAGEN certificato ISO, ogni lotto del kit *artus* HI Virus-1 QS-RGQ è stato testato in base a specifiche prestabilite per garantire la costante qualità del prodotto.

Limiti della metodica

L'uso di tutti i reagenti è riservato esclusivamente alla diagnostica in vitro.

L'utilizzo è consentito soltanto a personale dotato delle necessarie conoscenze e competenze in merito alle procedure della diagnostica in vitro.

Per ottenere risultati PCR ottimali è assolutamente necessario attenersi al protocollo.

Rispettare le date di scadenza dei singoli componenti, riportate sulla confezione e sulle etichette. Non utilizzare reagenti scaduti.

Sebbene accada raramente, eventuali mutazioni nelle regioni altamente conservate del genoma virale coperte dai primer e/o dalla sonda del kit possono essere causa di una sotto-quantificazione o perfino della mancata individuazione del virus. La validità e le prestazioni del kit vengono revisionate ad intervalli regolari.

Caratteristiche delle prestazioni

Vedere www.qiagen.com/products/artushivirusrtpcrkitce.aspx per le caratteristiche delle prestazioni del kit *artus* HI Virus-1 QS-RGQ.

Riferimenti citati

1. McCutchan, F.E. (2006) Global epidemiology of HIV. *J. Med. Virol.* **78** Suppl 1, S7.
2. Nikolopoulos, G., Tsiodras, S., Bonovas, S., and Hatzakis, A. (2012) Antiretrovirals for HIV exposure prophylaxis. *Curr. Med. Chem.* **19**, 5924.
3. Perrin, L., Kaiser, L., and Yerly, S. (2003) Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. *Lancet Infect. Dis.* **3**, 22.
4. Roques, P. et al. (2004) Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N. *AIDS* **18**, 1371.

Simboli



Contenuto sufficiente per <N> test



Data di scadenza



Dispositivo medico per diagnostica in vitro



Numero di catalogo



Numero di lotto



Numero di materiale



Componenti



Contiene



Numero



Global Trade Item Number



Limite di temperatura



Produttore



Consultare le istruzioni per l'uso



Attenzione

Informazioni sui contatti

Per ricevere assistenza tecnica e ulteriori informazioni, potete consultare il nostro sito www.qiagen.com/Support, chiamare il numero 00800-22-44-6000 o contattare il servizio di assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale (consultate il retro di copertina o visitate il sito www.qiagen.com).

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Indice	Cat n°
<i>artus</i> HI Virus-1 QS-RGQ Kit (24)	Per 24 reazioni: 2 master, 4 standard di quantificazione, controllo interno, acqua (grado PCR)	4513363
<i>artus</i> HI Virus-1 QS-RGQ Kit (72)	Per 72 reazioni: 2 master, 4 standard di quantificazione, controllo interno, acqua (grado PCR)	4513366
Sistema QIASymphony RGQ		
QIASymphony RGQ, System	QIASymphony SP, QIASymphony AS, Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, accessori e materiali di consumo necessari, installazione e addestramento	9001850

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili nel sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al proprio distributore locale.

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

L'acquisto di questo prodotto ne consente l'uso all'acquirente per l'esecuzione di servizi per la diagnostica umana in vitro. Con il presente non si concede nessun brevetto generico o licenza di altro tipo in aggiunta agli specifici diritti di utilizzo garantiti dall'acquisto.

Marchi commerciali: QIAGEN®, QIASymphony®, *artus*®, Rotor-Gene® (Gruppo QIAGEN).

Il kit *artus* HI Virus-1 QSRGQ è un dispositivo di diagnostica contrassegnato CE secondo la Direttiva Europea 98/79/CE concernente i dispositivi medico-diagnostici in vitro. Non disponibile in tutti i paesi.

Contratto di Licenza Limitato per il kit *artus* HI Virus-1 QS-RGQ

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione da parte dell'acquirente o dell'utente del prodotto dei seguenti termini:

1. Questo prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al presente manuale e soltanto con i componenti contenuti nel kit. QIAGEN non concede alcuna licenza, in relazione a qualunque proprietà intellettuale, per l'uso o l'aggiunta dei componenti del kit ad altri componenti non contenuti nel kit, ad eccezione di quanto descritto nei protocolli forniti insieme al prodotto, nel presente manuale e nei protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati forniti da utenti QIAGEN per altri utenti QIAGEN. Tali protocolli non sono stati completamente testati od ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non garantisce in alcun modo che non violino i diritti di terze parti.
2. Se non espressamente dichiarato nelle licenze, QIAGEN non garantisce in alcun modo che questi kit e/o il relativo impiego non violino i diritti di terze parti.
3. Il presente kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per l'impiego monouso e non possono essere riutilizzati, ripristinati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit concordano nel non consentire a nessuno di intervenire o consentire ad altri di realizzare o contribuire a realizzare azioni proibite. QIAGEN può imporre presso qualunque tribunale i divieti del presente Contratto di Licenza Limitato e recupererà tutte le spese di indagine e spese legali, comprese le parcelle degli avvocati, in qualunque azione per imporre il presente Contratto di Licenza Limitato o qualsiasi diritto di proprietà intellettuale correlato al kit e/o ai suoi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, consultare il sito www.qiagen.com.

© 2010-2014 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

