

Folha de aplicação QIASymphony® RGQ

Aplicação QIASymphony RGQ Kit *artus*® BK Virus QS-RGQ (tipo de amostra: urina, 800 µl)



Verificar a disponibilidade de novas revisões de rotulagem eletrónica em www.qiagen.com/products/artusbkvirusrgpckit.aspx antes da realização do teste. O estado de revisão atual é indicado pela data de lançamento (formato: mês/ano).

Informações gerais

| | |
|--|---|
| Kit | Kit <i>artus</i> BK Virus QS-RGQ, versão 1, REF 4514363 |
| Material de amostras validado | Urina |
| Purificação avançada | QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (Kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi) (n.º cat. 937055) |
| Volume da amostra (incluindo volume excedente) | 1000 µl |
| Conjunto de parâmetros de ensaio | artus_BKV_urine800_V4 |
| Conjunto de controlo do ensaio predefinido | Complex800_V6_DSP_artus_BKV |
| Volume de eluição | 60 µl |
| Versão de software necessária | Versão 4.0 ou posterior |
| Volume de mistura padrão (Master) | 10 µl |
| Volume modelo | 15 µl |
| Número de reações | 6–24* |
| Tempo de corrida no módulo AS | Para 6 reações: aproximadamente 8 minutos Para 72 reações: aproximadamente 35 minutos |

* Para a configuração do ensaio para o vírus BK, podem ser configurados até 216 (9 x 24) ensaios numa só corrida do QIASymphony AS.



Maio 2012

Sample & Assay Technologies

Materiais necessários mas não fornecidos

| | |
|---|--|
| Kit de purificação | ■ QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (Kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi) (n.º cat. 937055) |
| Adaptadores para o QIASymphony SP | ■ Elution Microtube Rack QS (Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym) (Suporte de microtubos de eluição QS (Adaptador de arrefecimento, EMT, v2, Qsym, n.º cat. 9020730)) ■ Tube Insert 3B (Introdutor de tubos 3B) (Insert, 2,0ml v2, samplecarr. (Introdutor, 2,0 ml v2, transportador de amostra) (24), Qsym, n.º cat. 9242083) |
| Consumíveis para o QIASymphony SP | ■ Sample Prep Cartridges (Cartuchos de preparação de amostras), 8 poços (n.º cat. 997002) ■ 8-Rod Covers (Mangas de 8 barras) (n.º cat. 997004) ■ Filter-Tips, 1500 µl (Pontas com filtros) (n.º cat. 997024) ■ Filter-Tips, 200 µl (Pontas com filtros) (n.º cat. 990332) ■ Elution Microtubes CL (Micro tubos de eluição CL) (n.º cat. 19588) ■ Tip disposal bags (Sacos de eliminação de pontas) (n.º cat. 9013395) ■ Micro tubes 2.0 ml Type H (Microtubos 2,0 ml tipo H) ou Micro tubes 2.0 ml Type I (Microtubos 2,0 ml tipo I), (Sarstedt, n.º cat. 72.693 e 72.694, www.sarstedt.com) para usar com amostras e controlos internos |
| Adaptadores e suportes de reagentes para o QIASymphony AS | ■ Reagent holder 1 QS (Suporte de reagente 1 QS) (Cooling Adapter (Adaptador de arrefecimento), Reagent Holder 1 (Suporte de reagente 1), Qsym, n.º cat. 9018090) ■ Reagent holder 2 QS (Suporte de reagente 2 QS) (Cooling Adapter (Adaptador de arrefecimento), Reagent Holder 2 (Suporte de reagente 2), Qsym, n.º cat. 9018089) ■ RG Strip Tubes (Tiras de tubos RG) 72 QS (Cooling Adapter (Adaptador de arrefecimento), RG Strip Tubes (Tiras de tubos RG) 72, Qsym, n.º cat. 9018092) |

Consumíveis para o
QIASymphony AS

- Strip Tubes and Caps (Tiras de tubos e tampas), 0,1 ml (n.º cat. 981103)
- Tubes, conical, 2 ml (Tubos, cónicos, 2 ml), Qsym AS (n.º cat. 997102)* ou Micro tubes 2.0 ml Type I (Microtubos 2,0 ml Tipo I) (Sarstedt, n.º cat. 72.694.005)
- Tube, conical (Tubo, cónico), 5 ml Qsym AS (n.º cat. 997104)* ou Tubes with flat base from PP (Tubos com base plana de PP) (Sarstedt, n.º cat. 60.558.001)
- Reagent Bottles (Frascos de reagente), 30 ml, Qsym AS (n.º cat. 997108)
- Elution Microtubes CL (Micro tubos de eluição CL) (n.º cat. 19588)
- Filter-Tips, 1500 µl (Pontas com filtros) (n.º cat. 997024)
- Filter-Tips, 200 µl (Pontas com filtros) (n.º cat. 990332)
- Filter-Tips, 50 µl (Pontas com filtros) (n.º cat. 997120)
- Tip disposal bags (Sacos de eliminação de pontas) (n.º cat. 9013395)

Para preparação de amostras
(urina)

- Buffer ATL, GPR (Tampão ATL, GPR) (n.º cat. 939016)

* Verificar a disponibilidade de stocks.

Armazenamento e manuseamento de amostras

Colheita da amostra Urina humana

Transporte de amostras Transporte à prova de estilhaços

Envio no prazo de 6 horas

Envio por correio de acordo com as instruções legais para o transporte de material patogénico*

Preparação da amostra Prevenir a formação de espuma nas ou sobre as amostras.

As amostras devem ser estabilizadas à temperatura ambiente (15–25 °C) antes de iniciar o ensaio.

*International Air Transport Association (IATA, Associação Internacional de Transporte Aéreo).
Dangerous Goods Regulations (Regulamentos para Mercadorias Perigosas).

Procedimento

Preparação do ARN transportador e adição do controlo interno para as amostras

A utilização do kit QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi em conjunto com o kit *artus* BK Virus QS-RGQ requer a introdução de um controlo interno (BK Virus RG IC) no procedimento de purificação para monitorizar a eficiência da preparação da amostra e ensaios a jusante.

Os controlos internos devem ser adicionados com a mistura de ARN transportador (CARRIER)-tampão AVE (AVE) e o volume total da mistura de controlo interno-ARN transportador (CARRIER)-tampão AVE (AVE) mantém-se em 120 μ l.

A tabela representa a adição do controlo interno ao isolamento numa proporção de 0,1 μ l por 1 μ l de volume de eluição. Recomendamos a preparação de misturas novas para cada corrida imediatamente antes de usar.

| Componente | Volume (μ l) (tubos Sarstedt®)* | Volume (μ l) (tubos BD™)† |
|--|---|-----------------------------------|
| ARN transportador de stock (CARRIER) | 3 | 3 |
| Controlo interno‡ | 9 | 9 |
| Tampão AVE | 108 | 108 |
| Volume final por amostra (excluindo volume morto) | 120 | 120 |
| Volume total para n amostras | (n x 120) + 360§ | (n x 120) + 600¶ |

* Micro tubes 2.0 ml Type H (Microtubos 2,0 ml tipo H) e Micro tubes 2.0 ml Type I (Microtubos 2,0 ml tipo I), Sarstedt, n.º cat. 72.693 e 72.694.

† Tubes 14 ml, 17 x 100 mm polystyrene round-bottom (Tubos de base redonda de 14 ml, 17 x 100 mm em poliestireno) (Becton Dickinson, n.º cat. 352051).

‡ O cálculo da quantidade de controlo interno baseia-se nos volumes de eluição iniciais (90 μ l). O volume morto adicional depende do tipo de tubo de amostra utilizado.

§ É necessária uma mistura de controlo interno correspondente a 3 amostras adicionais (ou seja, 360 μ l). Não encher mais de 1,92 ml de volume total (correspondente a um máximo de 13 amostras. Estes volumes são específicos para Micro tubes 2.0 ml Type H (Microtubos 2,0 ml tipo H) e Micro tubes 2.0 ml Type I (Microtubos 2,0 ml tipo I), Sarstedt, (n.º cat. 72.693 e 72.694).

¶ É necessária uma mistura de controlo interno correspondente a 5 amostras adicionais (ou seja, 600 μ l). Não encher mais de 13,92 ml de volume total (correspondente a um máximo de 111 amostras. Estes volumes são específicos para Tubes 14 ml, 17 x 100 mm polystyrene round-bottom (Tubos de base redonda de 14 ml, 17 x 100 mm em poliestireno) (Becton Dickinson, n.º cat. 352051)

Configuração do QIASymphony SP

Bandeja "Waste" (Resíduos)

| | |
|---|---|
| Suporte de caixa de unidades 1-4 | Caixas de unidades vazias |
| Suporte de saco de resíduos | Saco de resíduos |
| Suporte do frasco de resíduos líquidos | Esvaziar e instalar o frasco de resíduos líquidos |

Bandeja "Eluate" (Eluato)

| | |
|---------------------------|--|
| Suporte de eluição | Usar ranhura 1, posição de arrefecimento |
| Volume de eluição* | Volume de eluição pré-selecionado: 60 μ l Volume de eluição inicial: 90 μ l |

* O volume de eluição é pré-selecionado para o protocolo. Este é o volume acessível mínimo de eluato no tubo de eluição final. O volume inicial da solução de eluição é necessário para assegurar que o volume real de eluato é igual ao volume pré-selecionado.

Bandeja "Reagents and Consumables" (Reagentes e consumíveis)

| | |
|---|--|
| Posição A1 e/ou A2 | Carregar 1 cartucho de reagente (RC) para um máximo de 48 amostras ou 2 cartuchos de reagente (RC) novos para um máximo de 96 amostras |
| Posição B1 | Tampão ATL (ATL) |
| Posições do suporte de pontas 1-17 | Carregar suportes de pontas com filtro descartáveis suficientes, 200 μ l e 1500 μ l (ver Material plástico necessário para 1-4 lotes de amostras", página 6) |
| Suporte de caixa de unidades posição 1-4 | Carregar caixas de unidades contendo cartuchos de preparação de amostras e mangas de 8 barras (ver Material plástico necessário para 1-4 lotes de amostras", página 6) |

Bandeja "Sample" (Amostra)

| | |
|---|--|
| Tipo de amostra | Urina |
| Volume da amostra (incluindo volume excedente) | 1000 μ l |
| Tubos de amostras | Micro tubes 2.0 ml Type H (Microtubos 2,0 ml tipo H) ou Micro tubes 2.0 ml Type I (Microtubos 2,0 ml tipo I), (Sarstedt, n.º cat. 72.693 e 72.694) |
| Introdutor | Tube Insert 3B (Introdutor de tubo 3B) (n.º cat. 9242083) |

Material plástico necessário para 1-4 lotes de amostras

| | Um lote, 24 amostras* | Dois lotes, 48 amostras* | Três lotes, 72 amostras* | Quatro lotes, 96 amostras* |
|--|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Pontas com filtro descartáveis, 200 μ l†‡ | 34 | 60 | 86 | 112 |
| Pontas com filtro descartáveis, 1500 μ l†‡ | 123 | 205 | 295 | 385 |
| Cartuchos de preparação de amostras§ | 18 | 36 | 54 | 72 |
| Mangas de 8 barras¶ | 3 | 6 | 9 | 12 |

* Utilizar mais do que um tubo de controlo interno por lote e efetuar mais do que uma inventariação, requer pontas com filtro descartáveis adicionais.

† Estão disponíveis suportes de 32 pontas/pontas com filtros.

‡ O número de pontas com filtro necessárias inclui pontas com filtro para 1 inventariação por cartucho de reagente.

§ Estão disponíveis 28 cartuchos de preparação de amostras/caixa de unidades.

¶ Estão disponíveis doze mangas de 8 barras/caixa de unidades.

Configuração do QIASymphony AS

Consumíveis

Durante a configuração, as posições apropriadas para cada consumível no módulo QIASymphony AS são indicadas no ecrã tátil do instrumento.

| Consumíveis | Nome no ecrã tátil | Para uso com adaptador/ suporte de reagente |
|--|-----------------------------------|--|
| Tiras de tubos e tampas, 0,1 ml (250) | QIA#981103 *Tiras de tubos 0,1 | Tiras de tubos RG 72 QS |
| Tubos, cónicos, 2 ml, Qsym AS (500)*† | QIA#997102 *T2.0 ScrewSkirt‡ | Suporte de reagente 1 QS Suporte de reagente 2 QS |
| Tubo, cónico, 5 ml, Qsym AS (500)*† | QIA#997104 *T5.0 ScrewSkirt‡ | Suporte de reagente 1 QS Suporte de reagente 2 QS |
| Frascos de reagente, 30 ml, Qsym AS (50)* | QIA#997108 *Frasco 30 ml‡ | Suporte de reagente 2 QS |
| Microtubos de eluição CL (24 x 96) | QIA#19588 * EMTR | Suporte de microtubos de eluição QS |

* Para componentes da mistura padrão, mistura padrão preparada pelo sistema, standards de ensaio e controlos de ensaio.

† Alternativamente, podem ser usados os tubos Sarstedt descritos em "Materiais necessários mas não fornecidos", pág. 2.

‡ O sufixo "(m)" no ecrã tátil indica que os cálculos de nível do líquido para o respetivo tubo foram otimizados para os reagentes formando um menisco-côncavo.

Adaptadores e suportes de reagentes

| Suporte/Suporte de reagentes | Nome | Número necessário [§] |
|------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| Suporte de amostras | Suporte de microtubos de eluição QS | 1 |
| Suportes de reagentes | Suporte de reagente 1 QS | 1 |
| Suportes de ensaio | Tiras de tubos RG 72 QS | 1 |

[§] Calculado para uma corrida de ensaio com 72 reações.

Pontas com filtro

Carregar a bandeja "Eluate and Reagents" (Eluato e reagentes) com suportes de pontas a começar pelas ranhuras de pontas 1, 2 e 3 e carregar depois a bandeja "Assays" (Ensaio) com suportes de pontas, nomeadamente as ranhuras de pontas 7, 8 e 9.

| Consumível | Nome no ecrã tátil | Número mínimo para 24 reações | Número mínimo para 72 reações |
|--|---------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Pontas com filtro, 1500 μ l (1024) | 1500 μ l | 3 | 4 |
| Pontas com filtro, 200 μ l (1024) | 200 μ l | 5 | 5 |
| Pontas com filtro, 50 μ l (1024) | 50 μ l | 25 | 73 |
| Sacos de eliminação de pontas | - | 1 | 1 |

RT-PCR no Rotor-Gene Q

Ver a folha de protocolo específica do software "Settings to run *artus* QS-RGQ Kits" (Definições de corrida dos kits *artus* QS-RGQ) em www.qiagen.com/products/artusbkvirusrgpckit.aspx.

Definições específicas para o kit *artus* BK Virus QS-RGQ

O Rotor-Gene AssayManager define automaticamente os parâmetros para o kit *artus* BK Virus QS-RGQ.

Com o software Rotor-Gene 2.1, as definições específicas são mostradas abaixo.

| | |
|---|---|
| Volume de reação (µL) | 50 |
| Em espera | Manter a temperatura: 95 graus Tempo de espera: 10 min |
| Ciclos | 45 vezes 95 graus durante 15 s 65 graus durante 30 s 72 graus durante 20 s Ativar sempre a função "Touchdown" (diminuição de um grau a cada ciclo) para 10 ciclos no passo de "Annealing" (Anelamento). |
| Configuração da otimização de ganho automático | 65 graus (Amostras: Verde; IC: Laranja) |

Interpretação de resultados

Esta secção descreve a interpretação de resultados no Rotor-Gene Q. Rever também a informação de estado da amostra dos ficheiros de resultados do QIASymphony SP/AS para análise do fluxo de trabalho desde a amostra ao resultado. Apenas devem ser utilizadas amostras com um estado válido.

O Rotor-Gene AssayManager interpreta automaticamente os resultados da PCR e mostra uma conclusão e o resultado quantitativo.

As secções seguintes descrevem a interpretação dos resultados com o software Rotor-Gene da versão 2.1 ou superior.

Deteção de sinal e conclusões — urina 800 µl

| Sinal no canal Cycling Green | Sinal no canal Cycling Orange | Resultado quantitativo (cópias/ml) | Interpretação |
|------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|---|
| Sim | Sim | <78,5 | Resultado válido: ADN do vírus BK detetado, <100 cópias/ml A quantificação não é possível dado que o resultado quantitativo está abaixo do limite de deteção. A reprodutibilidade do resultado positivo não está assegurada. |
| Sim | Sim | ≥78,5 e <100 | Resultado válido: ADN do vírus BK detetado, <100 cópias/ml A quantificação não é possível dado que o resultado quantitativo está abaixo do intervalo linear do ensaio. |
| Sim | Sim | ≥100 e ≤1 x 10 ⁹ | Resultado válido: ADN do vírus BK detetado na concentração calculada O resultado quantitativo está dentro do intervalo linear do ensaio. |
| Sim | Sim | >1 x 10 ⁹ | Resultado válido: ADN do vírus BK detetado, >1 x 10 ⁹ cópias/ml A quantificação não é possível dado que o resultado quantitativo está acima do intervalo linear do ensaio.* |
| Não | Sim | – | Resultado válido: Não é detetável ADN de vírus BK.† |
| Não | Não | – | Resultado inválido: Não pode inferir-se qualquer resultado.‡ |

* Se a quantificação for desejada, diluir a amostra com a urina livre de vírus BK e reprocessar. Multiplicar o resultado quantitativo da amostra reprocessada pelo fator de diluição.

† Se o valor C_T para o controlo interno de uma amostra negativa for superior em mais de 3 ciclos ao valor C_T para o controlo interno do controlo sem modelo na corrida ($C_{T\text{ IC Amostra}} - C_{T\text{ IC NTC}} > 3$), a amostra deve ser tratada como inválida. Não pode inferir-se qualquer resultado.

‡ Podem ser encontradas informações sobre as fontes de erro e respetiva solução no “Troubleshooting guide” (Guia para a resolução de problemas) do *Manual do kit artus BK Virus QS-RGQ (artus BK Virus QS-RGQ Kit Handbook)*.

Configuração do limiar para a análise PCR

As definições de limiar ideal para uma determinada combinação do instrumento Rotor-Gene Q e do Kit *artus* QS-RGQ devem ser configuradas empiricamente, testando cada combinação individual, uma vez que se trata de um valor relativo que depende do processo de diagnóstico geral. O limiar pode ser definido num valor preliminar de 0,04 para a análise do primeiro procedimento de ensaio de PCR, mas este valor deve ser redefinido numa análise comparativa das corridas seguintes do fluxo de trabalho. O limiar deve ser definido manualmente mesmo acima do sinal de fundo dos controlos negativos e amostras negativas. O valor limiar médio calculado a partir destas experiências irá certamente funcionar para a maioria dos procedimentos de ensaio futuros, mas o utilizador deve, apesar disso, rever o valor limiar gerado a intervalos regulares. O valor limiar situar-se-á, normalmente, no intervalo de 0,03–0,05 e deve ser arredondado para não mais do que três casas decimais.

Quantificação

Os padrões de quantificação (BK Virus RG QS 1–4) do kit *artus* BK Virus QS-RGQ são tratados como amostras previamente purificadas, sendo utilizado o mesmo volume (15 µl). Para gerar uma curva padrão nos instrumentos Rotor-Gene Q, todos os 4 padrões de quantificação devem ser usados e definidos na caixa de diálogo “Edit Samples” (Editar amostras) no instrumento Rotor-Gene Q como padrões com as concentrações especificadas (consultar o manual do utilizador do instrumento).

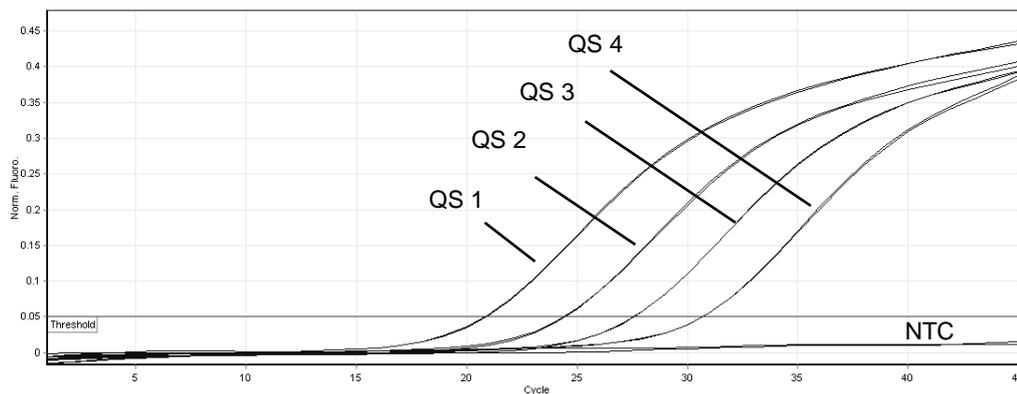
Nota: Os padrões de quantificação são definidos como cópias/µl. A seguinte equação tem de ser aplicada para converter os valores determinados usando a curva padrão para cópias/ml de material de amostra.

$$\text{Resultado (cópias/ml)} = \frac{\text{Resultado (cópias/}\mu\text{l)} \times \text{Volume de eluição inicial (90 }\mu\text{l)}^*}{\text{Volume de amostra (ml)}}$$

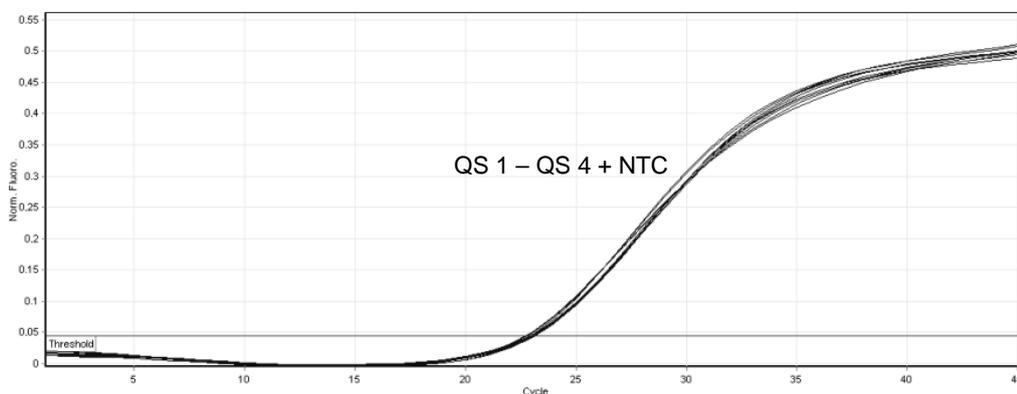
Como regra geral, o volume de amostra inicial deve ser introduzido na equação acima representada. Isto tem de ser considerado quando o volume da amostra tiver sido alterado antes da extração do ácido nucleico (por ex.: reduzindo o volume por centrifugação ou aumentando o volume adicionando ao volume necessário para o isolamento).

* O cálculo é baseado nos volumes de eluição iniciais (90 µl).

Exemplos de reações PCR positivas e negativas



Deteção dos padrões de quantificação (BK Virus RG QS 1–4) no canal de fluorescência Cycling Green. NTC: nenhum controle de modelo (controle negativo).



Deteção do controle interno (IC) no canal de fluorescência Cycling Orange com amplificação simultânea dos padrões de quantificação (BK Virus RG QS 1–4). NTC: nenhum controle de modelo (controle negativo).

Para obter informações de licenciamento atualizadas e renúncias de responsabilidade específicas do produto, consultar o respetivo manual do utilizador ou o manual do kit QIAGEN. Os manuais do kit QIAGEN e do utilizador estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser pedidos à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Marcas comerciais: QIAGEN®, QIASymphony®, artus®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); BD™ (Becton, Dickinson and Company); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.).

© 2012 QIAGEN. Todos os direitos reservados.

www.qiagen.com

Canada = 800-572-9613

China = 021-3865-3865

Denmark = 80-885945

Finland = 0800-914416

France = 01-60-920-930

Germany = 02103-29-12000

Hong Kong = 800 933 965

Ireland = 1800 555 049

Italy = 800-787980

Japan = 03-6890-7300

Korea (South) = 1544 7145

Luxembourg = 8002 2076

Mexico = 01-800-7742-639

The Netherlands = 0800 0229592

Norway = 800-18859

Singapore = 65-67775366

Spain = 91-630-7050

Sweden = 020-790282

Switzerland = 055-254-22-11

UK = 01293-422-911

USA = 800-426-8157

Australia = 1-800-243-800

Austria = 0800/281010

Belgium = 0800-79612

Brazil = 0800-557779



Sample & Assay Technologies