

# Folha de aplicação QIASymphony® RGQ

## Aplicação QIASymphony RGQ artus® BK Virus QS-RGQ Kit (tipo de amostra: urina, 400 µl)



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

### Informações gerais

Kit	artus BK Virus QS-RGQ Kit, versão 1, <b>REF</b> 4514363
Material de amostras validado	Urina
Purificação avançada	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (n.º cat. 937055)
Volume da amostra (incluindo volume excedente)	500 µl
Conjunto de parâmetros de ensaio	artus_BKV_urine400_V4
Conjunto de controlo do ensaio predefinido	Complex400_V4_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.

**Mai 2012**



Sample & Assay Technologies

## Materiais necessários, mas não fornecidos

Kit de purificação	■	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (n.º cat. 937055)
Adaptadores para o QIASymphony SP	■	Suporte de microtubos de eluição QS (Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym, n.º cat. 9020730)
	■	Introdutor de tubos 3B (Insert, 2,0ml v2, samplecarr. (24), Qsym, n.º cat. 9242083)
Consumíveis para o QIASymphony SP	■	Sample Prep Cartridges, 8-well (Cartuchos de prep. da amostra, 8 poços) (n.º cat. 997002)
	■	8-Rod Covers (Mangas de 8 barras) (n.º cat. 997004)
	■	Filter-Tips (Pontas com filtro), 1500 µl (n.º cat. 997024)
	■	Filter-Tips (Pontas com filtro), 200 µl (n.º cat. 990332)
	■	Elution Microtubes CL (Microtubos de eluição CL) (n.º cat. 19588)
	■	Tip disposal bags (Sacos para eliminação de pontas) (n.º cat. 9013395)
Adaptadores e suportes de reagentes para o QIASymphony AS	■	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, <a href="http://www.sarstedt.com">www.sarstedt.com</a> ) para usar com amostras e controlos internos
	■	Suporte de reagente 1 QS (Cooling Adapter, Reagent Holder 1, Qsym, n.º cat. 9018090)
	■	Suporte de reagente 2 QS (Cooling Adapter, Reagent Holder 2, Qsym, n.º cat. 9018089)
Consumíveis para o QIASymphony AS	■	Tiras de tubos RG 72 QS (Cooling Adapter, RG Strip Tubes 72, Qsym, n.º cat. 9018092)
	■	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 (Fracos de reagente), 30 ml, Qsym AS (n.º cat. 997108)
	■	Elution Microtubes CL (Microtubos de eluição CL) (n.º cat. 19588)
	■	Filter-Tips (Pontas com filtro), 1500 µl (n.º cat. 997024)
	■	Filter-Tips (Pontas com filtro), 200 µl (n.º cat. 990332)
	■	Filter-Tips (Pontas com filtro), 50 µl (n.º cat. 997120)
	■	Tip disposal bags (Sacos para 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.

---

## Manuseamento e armazenamento 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	Impedir a formação de espuma nas amostras.  As amostras devem ser estabilizadas à temperatura ambiente (15–25 °C) antes de iniciar a corrida.

\*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 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  $\mu$ l.

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

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

\* Microtubos 2,0 ml tipo H e microtubos 2,0 ml tipo I, Sarstedt, n.º cat. 72.693 e 72.694.

† (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  $\mu$ 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  $\mu$ l). Não encher mais de 1,92 ml de volume total (correspondente a um máximo de 13 amostras). Estes volumes são específicos para microtubos 2,0 ml tipo H e 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  $\mu$ l). Não encher mais de 13,92 ml de volume total (correspondente a um máximo de 111 amostras). Estes volumes são específicos para tubos de base redonda de 14 ml, 17 x 100 mm em poliestireno (Becton Dickinson, cat. n.º 352051).

## Configuração do QIASymphony SP

### Bandeja "Waste" (Resíduos)

<b>Suporte de caixa de unidades 1–4</b>	Caixas de unidades vazias
<b>Suporte de saco de resíduos</b>	Saco de resíduos
<b>Suporte do frasco de resíduos líquidos</b>	Esvaziar e instalar o frasco de resíduos líquidos

### Bandeja "Eluate" (Eluato)

<b>Suporte de eluição</b>	Usar ranhura 1, posição de arrefecimento
<b>Volume de eluição*</b>	Volume de eluição pré-selecionado: 60 $\mu$ l Volume de eluição inicial: 90 $\mu$ l

\* O volume de eluição está 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)

<b>Posição A1 e/ou A2</b>	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
<b>Posição B1</b>	Tampão ATL (ATL)
<b>Posições do suporte de pontas 1–17</b>	Carregar suportes de pontas com filtro descartáveis suficientes, 200 $\mu$ l e 1500 $\mu$ l (ver "Material plástico necessário para 1–4 lotes de amostras", página 6)
<b>Suporte de caixa de unidades posição 1–4</b>	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)

<b>Tipo de amostra</b>	Urina
<b>Volume da amostra (incluindo volume excedente)</b>	500 $\mu$ l
<b>Tubos de amostras</b>	Microtubos 2,0 ml tipo H ou Microtubos 2,0 ml tipo I, (Sarstedt, n.º cat. 72.693 e 72.694)
<b>Introdutor</b>	Introdutor de tubo 3B (n.º cat. 9242083)

## Material plástico necessário para 1–4 lotes de amostras

	<b>Um lote, 24 amostras*</b>	<b>Dois lotes, 48 amostras*</b>	<b>Três lotes, 72 amostras*</b>	<b>Quatro lotes, 96 amostras*</b>
<b>Pontas com filtro descartáveis, 200 <math>\mu</math>l<sup>†‡</sup></b>	34	60	86	112
<b>Pontas com filtro descartáveis, 1500 <math>\mu</math>l<sup>†‡</sup></b>	123	205	295	385
<b>Cartuchos de preparação de amostras<sup>§</sup></b>	18	36	54	72
<b>Mangas de 8 barras<sup>¶</sup></b>	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 filtro

‡ 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, padrões de ensaio e controlos de ensaio.

† Em alternativa, podem ser usados os tubos Sarstedt descritos em “Materiais necessários, mas não fornecidos”, página 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 <sup>§</sup>
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

<sup>§</sup> 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.

<b>Consumível</b>	<b>Nome no ecrã tátil</b>	<b>Número mínimo para 24 reações</b>	<b>Número mínimo para 72 reações</b>
Pontas com filtro, 1500 $\mu$ l (1024)	1500 $\mu$ l	3	4
Pontas com filtro, 200 $\mu$ l (1024)	200 $\mu$ l	5	5
Pontas com filtro, 50 $\mu$ l (1024)	50 $\mu$ l	25	73
Sacos de eliminação de pontas	–	1	1

---

## RT-PCR no Rotor-Gene Q

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

<b>Volume de reação (µL)</b>	50
<b>Manter</b>	Manter a temperatura: 95 graus Manter o tempo: 10 min
<b>Ciclos</b>	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).
<b>Configuração da otimização de ganho automático</b>	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 400 µl

Sinal no canal Cycling Green	Sinal no canal Cycling Orange	Resultado quantitativo (cópias/ml)	Interpretação
Sim	Sim	<81,8	Resultado válido: ADN do vírus BK detetado, <250 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	≥81,8 e <250	Resultado válido: ADN do vírus BK detetado, <250 cópias/ml A quantificação não é possível dado que o resultado quantitativo está abaixo do intervalo linear do ensaio.
Sim	Sim	≥250 e ≤1 x 10 <sup>9</sup>	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 <sup>9</sup>	Resultado válido: ADN do vírus BK detetado, >1 x 10 <sup>9</sup> 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 ( $C_{T\ IC\ amostra} - C_{T\ IC\ NTC} > 3$ ), 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 empiricamente configuradas, 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 limite deve ser definido manualmente mesmo acima do sinal de fundo dos controlos negativos e amostras negativas. O valor limite médio calculado a partir destas experiências irá certamente funcionar para a maioria dos procedimentos de ensaio futuros, mas o utilizador deve, contudo, rever em intervalos regulares o valor limite gerado. O valor limite 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).

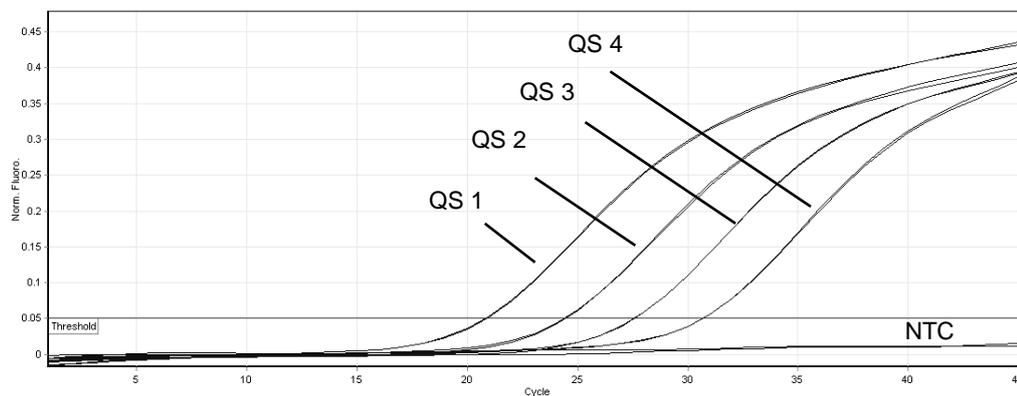
**Nota:** Os padrões de quantificação são definidos como cópias/µl. A seguinte equação tem de ser aplicada para converter os valores determinados usando a curva padrão para cópias/ml de material de amostra.

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

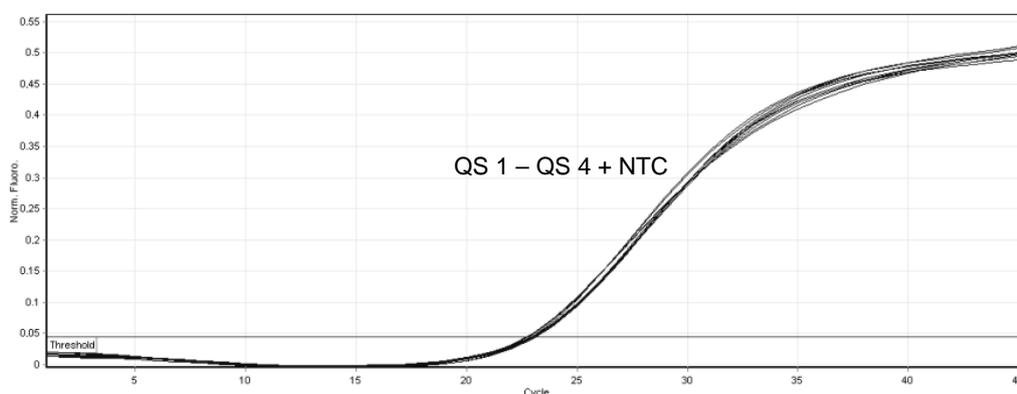
Como regra geral, o volume de amostra inicial deve ser introduzido na equação acima representada. Isto tem de ser considerado quando o volume da amostra tiver sido alterado antes da extração do ácido nucleico (por ex.: reduzir o volume por centrifugação ou aumentar o volume adicionando ao volume necessário 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 renúncia de responsabilidades específicas do produto, consultar o manual do utilizador ou o manual de instruções do kit QIAGEN respetivo. Os manuais do kit QIAGEN e do utilizador estão disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ou podem ser pedidos à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Marcas registadas: 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](http://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