

Abril 2019

Ficha de Aplicação do QIAasymphony[®] RGQ

artus[®] BK Virus QS-RGQ Kit
(tipo de amostra: plasma)

R2



4514363

artus BK Virus QS-RGQ Kit, versão 1



Antes da execução do teste, verifique a disponibilidade de novas revisões de classificação eletrônica em www.qiagen.com/products/artusbkviruspcrkitce.aspx.

Informações gerais

Kit	<i>artus</i> BK Virus QS-RGQ Kit, Versão 1 (ref. 4514363)
Material de amostra validado	Plasma humano com EDTA
Purificação primária	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (ref. 937055)
Volume da amostra (incluindo o volume excedente)	1200 µL
Conjunto de parâmetros do ensaio	<i>artus_BKV_plasma1000_V5</i>
Conjunto de controles de ensaio padrão	<i>Cellfree1000_V7_DSP_artus_BKV</i>
Volume de eluição	60 µL
Versão de software necessária	Versão 4.0 ou superior
Volume da mistura principal	10 µl
Volume do modelo	15 µl
Número de reações	6–24
Tempo de execução no módulo AS	Para 6 reações: aproximadamente 8 minutos Para 72 reações: aproximadamente 35 minutos

Materiais necessários, mas não fornecidos

Kit de purificação

- QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (ref. 937055)

Adaptadores para o QIASymphony SP

- Elution Microtube Rack QS (Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym, ref. 9020730)
- Estrutura de transferência
- Tube Insert 3B (Introdutor, 2.0ml v2, samplecarr. (24), Qsym, ref. 9242083)

Consumíveis para o QIASymphony SP

- Sample Prep Cartridges, 8-well (ref. 997002)
- 8-Rod Covers (ref. 997004)
- Filter-Tips, 1500 µl (ref. 997024)
- Filter-Tips, 200 µl (ref. 990332)
- Elution Microtubes CL (ref. 19588)
- Tip disposal bags (ref. 9013395)
- Micro tubes 2.0 ml Type H ou Micro tubes 2.0 ml Type I (Sarstedt®, ref. 72.693 e 72.694, www.sarstedt.com), para uso com amostras e controles internos

Adaptadores e suportes de reagentes para o QIASymphony AS

- Reagent holder 1 QS (Cooling Adapter, Reagent Holder 1, Qsym, ref. 9018090)
- RG Strip Tubes 72 QS (Cooling Adapter, RG Strip Tubes 72, Qsym, ref. 9018092)

Consumíveis para o QIASymphony AS

- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (ref. 981103)
- Tubes, conical, 2 ml, Qsym AS (ref. 997102) ou Micro tubes 2.0 ml Type I (Sarstedt, ref. 72.694.005)
- Como alternativa: Tubes, conical, 5 ml, Qsym AS (ref. 997104) ou Tubes with flat base from PP (Sarstedt, ref. 60.558.001)
- Filter-Tips, 1500 µl (ref. 997024)
- Filter-Tips, 200 µl (ref. 990332)
- Filter-Tips, 50 µl (ref. 997120)
- Tip disposal bags (ref. 9013395)

Armazenamento e manuseio de amostras

Coleta de amostras	Amostra de sangue 5–10 ml de sangue com EDTA 8x no misturador suspenso – sem agitar! Amostras humanas heparinizadas não devem ser usadas.
Armazenamento das amostras	Separação: 20 minutos de centrifugação, 800–1600 x g dentro de 24 horas após a coleta Transfira o plasma isolado para um tubo estéril de polipropileno A sensibilidade do ensaio pode ser reduzida se as amostras estiverem congeladas por uma questão de rotina ou se estiverem armazenados por um longo período de tempo.
Transporte das amostras	Transporte resistente a quebras Envio dentro de 24 horas Envio por correio de acordo com as instruções legais para o transporte de material patogênico* As amostras de sangue devem ser enviadas resfriadas (2 a 8 °C)
Substâncias interferentes	A heparina (≥ 10 IU/ml) afeta a PCR. Não devem ser usadas amostras coletadas em tubos que contenham heparina como anticoagulante ou amostras de pacientes heparinizados.
Preparo de amostras	Evite a formação de espuma nas amostras ou sobre elas As amostras devem ser mantidas à temperatura ambiente (15–25 °C) antes de iniciar o ensaio.

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

Procedimento

Preparação do RNA transportador e adição do controle interno às amostras

O uso do QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit em combinação com o *artus* BK Virus QS-RGQ Kit exige a introdução do controle interno (BK Virus RG IC) no procedimento de purificação para monitorar a eficiência do preparo de amostras e do ensaio posterior.

Os controles internos devem ser adicionados com a mistura de RNA transportador (CARRIER) e Buffer AVE (AVE). O volume total da mistura de controle interno, RNA transportador (CARRIER) e Buffer AVE (AVE) continua sendo 120 µl.

A tabela representa a adição do controle interno ao isolado em uma proporção de 0,1 µl por 1 µl de volume de eluição. É recomendável preparar misturas frescas para cada ensaio logo antes de sua utilização.

Alternativamente, a ferramenta “IC Calculator” (Calculadora IC) no QIASymphony Management Console pode ser usada.

Componente	Volume (µl) (tubos Sarstedt)*	Volume (µl) (tubos Corning)†
RNA transportador (CARRIER) concentrado	5	5
Controle interno‡	9	9
Buffer AVE	106	106
Volume final por amostra (excluindo o volume morto)	120	120
Volume total para n amostras	$(n \times 120) + 360^{\S}$	$(n \times 120) + 600^{\parallel}$

* Micro tubes 2.0 ml Type H e Micro tubes 2.0 ml Type I, Sarstedt, ref. 72.693 e 72.694.

† Tubes 14 ml, 17 x 100 mm polystyrene round-bottom (Corning® Inc., ref. 352051; Becton Dickinson era a antiga fornecedora deste tubo e Corning Inc. é a nova fornecedora).

‡ O cálculo da quantidade de controle interno baseia-se nos volumes iniciais de eluição (90 µl). O volume morto adicional depende do tipo de tubo de amostra usado.

§ É necessária uma mistura de controle interno correspondente a 3 amostras adicionais (ou seja, 360 µl). Não ultrapasse o volume total de 1,92 ml (correspondente ao máximo de 13 amostras). Esses volumes são específicos para Micro tubes 2.0 ml Type H e Micro tubes 2.0 ml Type I, Sarstedt, ref. 72.693 e 72.694).

¶ É necessária uma mistura de controle interno correspondente a 5 amostras adicionais (ou seja, 600 µl). Não ultrapasse o volume total de 13,92 ml (correspondente ao máximo de 111 amostras). Esses volumes são específicos para Tubes 14 ml, 17 x 100 mm polystyrene round-bottom, Corning Inc., ref. 352051; Becton Dickinson era a antiga fornecedora deste tubo e Corning Inc. é a nova fornecedora).

Configuração do QIASymphony SP

Gaveta "Waste" (Resíduos)

Suporte de caixa unitária, 1–4	Caixas unitárias vazias
Suporte de saco de resíduos	Saco de resíduos
Suporte de recipiente de resíduos líquidos	Esvaziar e instalar o recipiente de resíduos líquidos

Gaveta "Eluate" (Eluato)

Rack de eluição	Elution Microtubes CL em Elution Microtube Rack QS e estrutura de transferência Usar o compartimento 1, posição de resfriamento
Volume de eluição*	Volume de eluição selecionado previamente: 60 µl Volume de eluição inicial: 90 µl

* O volume de eluição é selecionado previamente para o protocolo. Esse é o volume mínimo acessível de eluato no tubo de eluição final. O volume inicial da solução de eluição é necessário para garantir que o volume real de eluato seja igual ao volume selecionado previamente.

Gaveta "Reagents and Consumables" (Reagentes e consumíveis)

Posições 1 e 2 do RC	Carregue 1 cartucho de reagentes (Reagent Cartridge, RC) para até 48 amostras ou 2 novos cartuchos de reagentes (RC) para até 96 amostras
Posições dos suportes de rack para ponteiros, 1–18	Carregue racks de ponteiros com filtro descartáveis suficientes, 200 µl e 1500 µl (consulte "Artigos de plástico necessários para 1 a 4 lotes de amostra", na página 7)
Posições do suporte de caixa unitária, 1–4	Carregue as caixas unitárias com cartuchos de preparo de amostras e as 8-Rod Covers (consulte "Artigos de plástico necessários para 1 a 4 lotes de amostra", na página 7)

Gaveta "Sample" (Amostra)

Tipo de amostra	Plasma humano com EDTA
Volume da amostra (incluindo o volume excedente)	1200 µL
Tubos de amostra	Micro tubes 2.0 ml Type H ou Micro tubes 2.0 ml Type I (Sarstedt, ref. 72.693 e 72.694)
Introdutor	Tube Insert 3B (ref. 9242083)

Artigos de plástico necessários para 1 a 4 lotes de amostra

Componente	Um lote, 24 amostras*	Dois lotes, 48 amostras*	Três lotes, 72 amostras*	Quatro lotes, 96 amostras*
Disposable filter-tips, 200 µl†‡	28	52	76	100
Disposable filter-tips, 1500 µl†‡	113	206	309	402
Sample prep cartridges§	21	42	54	72
8-Rod Covers¶	3	6	9	12

* O uso de mais de um tubo de controle interno por lote e a execução de mais de uma verificação de inventário exige ponteiras com filtro descartáveis adicionais.

† Há 32 ponteiras com filtro por rack para ponteiras.

‡ O número necessário de ponteiras com filtro inclui as ponteiras com filtro para 1 verificação de inventário por cartucho de reagentes.

§ Há 28 cartuchos de preparo de amostras por caixa unitária.

¶ Há doze 8-Rod Covers por caixa unitária.

Configuração do QIASymphony AS

Consumíveis

Durante a configuração, as posições adequadas de cada consumível no módulo QIASymphony AS são indicadas na tela sensível ao toque do instrumento.

Consumível	Nome na tela sensível ao toque	Para uso com adaptador/ suporte de reagentes
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	QIA#981103 *StripTubes 0.1	RG Strip Tubes 72 QS
Tubes, conical, 2 ml, Qsym AS (500) ^{†‡}	QIA#997102 *T2.0 ScrewSkirt [§]	Reagent holder 1 QS
Tubes, conical, 5 ml, Qsym AS (500) ^{†‡}	QIA#997104 *T5.0 ScrewSkirt [§]	Reagent holder 1 QS

* Indica o material de laboratório que pode ser resfriado usando um adaptador de resfriamento com código de barras.

[†] Para componentes da mistura principal, mistura principal preparada pelo sistema, padrões do ensaio e controles do ensaio.

[‡] Como alternativa, podem ser usados os tubos Sarstedt descritos em “Materiais necessários, mas não fornecidos”, na página 3.

[§] O sufixo “(m)” na tela sensível ao toque indica que os cálculos de nível de líquido do tubo correspondente foram otimizados para reagentes que formam um menisco côncavo.

Adaptadores e suportes de reagentes

Rack/suporte de reagentes	Nome	Número necessário [¶]
Suportes de reagentes	Reagent holder 1 QS	1
Racks de amostra	RG Strip Tubes 72 QS	1

[¶] Calculado para um ensaio com 72 reações.

Ponteiras com filtro

Carregue os racks para ponteiras com os compartimentos 1, 2 e 3 na gaveta “Eluate and Reagents” (Eluato e reagentes) e, em seguida, carregue os racks para ponteiras nos compartimentos 7, 8 e 9 na gaveta “Assays” (Ensaio).

Consumível	Nome na tela sensível ao toque	Número mínimo para 24 reações	Número mínimo para 72 reações
Filter-Tips, 1500 µl (1024)	1500 µl	3	4
Filter-Tips, 200 µl (1024)	200 µl	5	5
Filter-Tips, 50 µl (1024)	50 µl	25	73
Tip Disposal Bags	–	1	1

PCR no Rotor-Gene Q*

Consulte a ficha de protocolo específica do software, *Configurações para executar os artus QS-RGQ Kits*, em www.qiagen.com/products/artusbkviruspcrkite.aspx para obter mais detalhes sobre o protocolo.

Configurações específicas do *artus* BK Virus QS-RGQ Kit

Com o software Rotor-Gene® Q 2.1 ou superior, as configurações específicas são exibidas abaixo.

Reaction Volume (Volume de reação) (µL)	50 Embora o volume de reação física seja 25 µl, certifique-se de selecionar 50 para o volume de reação no software do Rotor-Gene Q.
Hold (Espera)	Temperatura em espera: 95 graus Tempo de espera: 10 minutos
Cycling (Ciclagem)	45 vezes 95 graus para 15 segundos 65 graus para 30 segundos (Adquirir no canal Green, Orange e ativar função de touchdown por 10 ciclos) 72 graus para 20 segundos
Auto-Gain Optimisation Setup (Configuração de otimização de ganho automático)	65 graus (Amostras: Green; IC: Orange)

Interpretação dos resultados

Esta seção descreve a interpretação dos resultados no Rotor-Gene Q. Para a análise do fluxo de trabalho completo da amostra até o resultado, avalie também as informações de status da amostra dos arquivos de resultado do QIASymphony SP/AS. Devem ser usadas apenas amostras com um status válido.

O *artus* BK Virus QS-RGQ Kit pode ser executado no Rotor-Gene Q usando análise manual com o software Rotor-Gene Q 2.1 ou superior. As seções a seguir descrevem a interpretação dos resultados com o uso do software Rotor-Gene Q 2.1 ou superior.

* Caso aplicável, um instrumento Rotor-Gene Q 5plex HRM com data de fabricação de janeiro de 2010 ou posterior. A data de fabricação pode ser determinada pelo número de série na parte traseira do instrumento. O número de série está no formato "mmaannn", sendo que "mm" indica o mês de fabricação em dígitos, "aa" indica os últimos dois dígitos do ano de fabricação e "nnn" indica o identificador único do instrumento.

Detecção de sinal e conclusões

Sinal no canal Cycling Green	Sinal no canal Cycling Orange	Resultado quantitativo (cópias/ml)	Interpretação
Sim	Sim	<26,7	Resultado válido: DNA do vírus BK detectado, <50 cópias/ml. Não foi possível fazer a quantificação, pois o resultado quantitativo está abaixo do limite de detecção. A reprodutibilidade do resultado positivo não é garantida.
Sim	Sim	≥26,7 e <50	Resultado válido: DNA do vírus BK detectado, <50 cópias/ml. Não foi possível fazer a quantificação, pois o resultado quantitativo está abaixo do intervalo linear do ensaio.
Sim	Sim/Não*	≥50 e ≤9,3 x 10 ⁷	Resultado válido: DNA do vírus BK detectado na concentração calculada. O resultado quantitativo está dentro do intervalo linear do ensaio.
Sim	Sim/Não*	>9,3 x 10 ⁷	Resultado válido: DNA do vírus BK detectado, >9,3 x 10 ⁷ cópias/ml. Não foi possível fazer a quantificação, pois o resultado quantitativo está acima do intervalo linear do ensaio.†
Não	Sim	–	Resultado válido: Nenhum DNA do vírus BK detectável.‡
Não	Não	–	Resultado inválido: Nenhum resultado pode ser concluído.§

* Neste caso, é dispensável a detecção de um sinal do canal Cycling Orange, dado que as concentrações iniciais altas do DNA do vírus BK (sinal positivo no canal Cycling Green) podem levar a um sinal fluorescente reduzido ou ausente do controle interno no canal Cycling Orange (concorrência).

† Se a quantificação for desejada, dilua a amostra com plasma sem o vírus BK e reprocessa. Multiplique o resultado quantitativo da amostra reprocessada pelo fator de diluição.

‡ Se o valor de C_T para o controle interno de uma amostra negativa for maior em mais de 3 ciclos do que o valor de C_T do controle interno do NTC no ensaio (C_T amostra IC – C_T IC NTC >3), a amostra deverá ser tratada como inválida. Nenhum resultado pode ser concluído.

§ As informações a respeito das origens dos erros e suas soluções encontram-se no “Guia de solução de problemas” do Manual do artus BK Virus QS-RGQ Kit.

Configuração de limiar da análise de PCR

As configurações ideais de limiar de uma determinada combinação do instrumento Rotor-Gene Q e do *artus* QS-RGQ Kit devem ser definidas empiricamente, testando cada combinação, dado que se trata de um valor relativo que depende do fluxo de trabalho global do diagnóstico. O limiar pode ser definido em um valor preliminar de 0,04 para a análise do primeiro ensaio de PCR, mas esse valor deve ser ajustado em uma análise comparativa dos próximos ensaios do fluxo de trabalho. O limiar deve ser definido manualmente, logo acima do sinal de fundo dos controles negativos e amostras negativas. O valor médio do limiar calculado a partir desses experimentos provavelmente funcionará para a maioria dos próximos ensaios, mas o usuário deve, ainda assim, analisar o valor do limiar gerado regularmente. Normalmente, o valor do limiar ficará no intervalo de 0,03 a 0,05 e deve ser arredondado para, no máximo, três casas decimais.

Quantificação

Os padrões de quantificação (Vírus BK QS 1–4) no *artus* BK Virus QS-RGQ Kit são tratados como amostras purificadas previamente e o mesmo volume é usado (15 µl). Para gerar uma curva padrão nos instrumentos Rotor-Gene Q, os 4 padrões de quantificação devem ser utilizados e definidos na caixa de diálogo Edit Samples (Editar amostras) no instrumento Rotor-Gene Q como padrões com as concentrações especificadas (consulte o manual do usuário do instrumento).

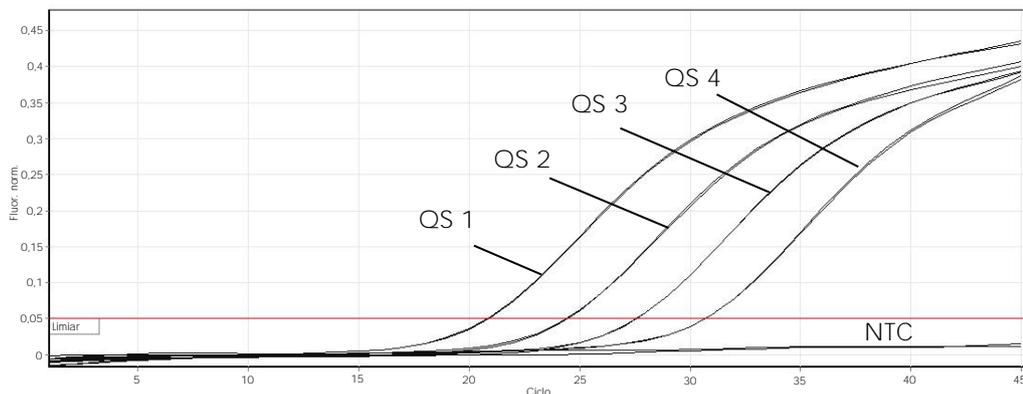
Observação: Os padrões de quantificação são definidos como cópias/µl no eluato. A equação a seguir deve ser aplicada para a conversão dos valores determinados utilizando a curva padrão em cópias/ml do material de amostra.

$$\text{Resultado em material de amostra (cópias/ml)} = \frac{\text{Resultado no eluato (cópias/}\mu\text{l)} \times \text{volume de eluição inicial (90 }\mu\text{l)}^*}{\text{Volume da amostra (ml)}}$$

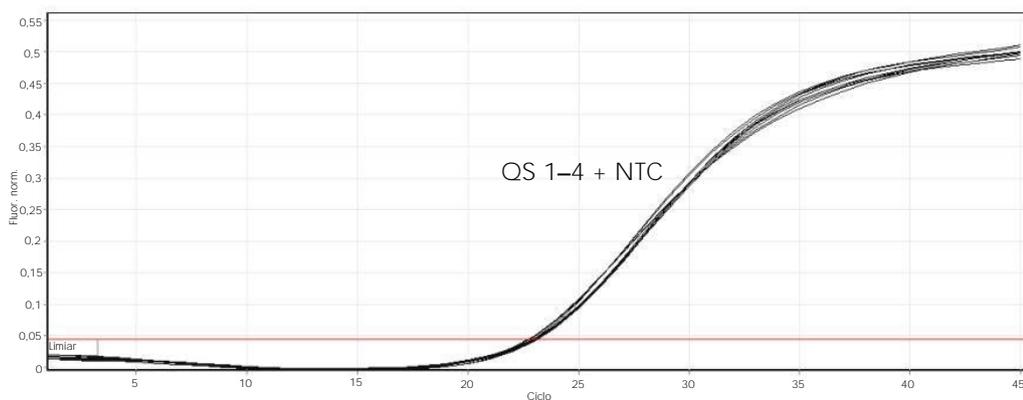
Por uma questão de princípio, o volume de amostra inicial deve ser inserido na equação acima. Isso deve ser considerado quando o volume da amostra tiver sido alterado antes da extração do ácido nucleico (por exemplo, diminuindo o volume por centrifugação ou aumentando o volume ao completar o volume necessário ao isolamento).

* O cálculo baseia-se nos volumes iniciais de eluição (90 µl).

Exemplos de reações de PCR positivas e negativas



Detecção de padrões de quantificação (Vírus BK QS 1-4) no canal de fluorescência Cycling Green. NTC: No template control (Controle sem amostra) (controle negativo).



Detecção do controle interno (Internal Control, IC) no canal de fluorescência Cycling Orange com amplificação simultânea dos padrões de quantificação (Vírus BK QS 1-4). NTC: No template control (Controle sem amostra) (controle negativo).

Histórico de revisões do documento

R2, Abril 2019	Remoção do rodapé com relação à configuração de 216 ensaios. Alteração para as novas versões dos protocolos do QIASymphony. Atualização dos materiais exigidos para a configuração de, no máximo, 72 reações. Adição de informações sobre o uso da ferramenta "IC Calculator" (Calculadora IC) do QMC. Atualização do nome dos materiais de laboratório Corning (previamente Becton Dickinson). Adição de configurações específicas de ensaio para o Rotor-Gene Q (volume, uso da função de touchdown, aquisições). Adição de informações sobre a interpretação de resultados para incluir o caso "positivo para patógenos e negativo para IC". Remoção de instruções sobre o uso do Rotor-Gene AssayManager®; alteração da redação de RT-PCR para PCR a fim de tornar mais claro; esclarecimento da diferença entre eluato e concentração de amostra no cálculo de quantificação
----------------	---

Para obter informações de licenciamento atualizadas e isenções de responsabilidade específicas do produto, consulte o manual do usuário ou o manual do kit QIAGEN correspondente. Os manuais do usuário e os manuais de kits QIAGEN estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados à Assistência Técnica da QIAGEN ou ao seu distribuidor local.

Marcas registradas: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, artus®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Group); Corning® (Corning Inc.); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.). Os nomes registrados, marcas registradas etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcados especificamente como tal, devem ser considerados protegidos pela lei.
04/2019 HB-0399-S01-002 © 2012–2019 QIAGEN, todos os direitos reservados.

