

Hoja de aplicación QIASymphony® RGQ

Aplicación QIASymphony RGQ Kit *artus*® HBV QS-RGQ (tipo de muestra: plasma)



Compruebe la disponibilidad de nuevas versiones de la documentación electrónica en www.qiagen.com/products/artushbvpcrkitce.aspx antes de realizar la prueba. El estado de revisión actual viene indicado por la fecha de publicación (formato: mes/año).

Información general

| | |
|--|--|
| Kit | Kit <i>artus</i> HBV QS-RGQ, versión 1, REF 4506363, 4506366 |
| Material de muestras validado | Plasma humano con EDTA |
| Purificación inicial | Kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi (n.º de referencia 937055) |
| Volumen de la muestra (incluido el volumen sobrante) | 1.200 µl |
| Conjunto de parámetros del ensayo | artus_HBV_plasma1000_V4 |
| Juego de controles predeterminado del ensayo | Cellfree1000_V6_DSP_artus_HBV |
| Volumen de elución | 60 µl |
| Versión del software requerida | Versión 4.0 o superior |
| Volumen de mezcla maestra | 30 µl |
| Volumen de molde | 20 µl |
| Número de reacciones | 7-24 o 7-72* |
| Tiempo de procesamiento en el módulo AS | Para 7 reacciones: aproximadamente 7 minutos Para 72 reacciones: aproximadamente 35 minutos |

* Para la preparación del ensayo para el virus de la hepatitis B (VHB), puede prepararse un máximo de 216 (3 x 72) ensayos en una única serie analítica en el instrumento QIASymphony AS.

Mayo 2012



Sample & Assay Technologies

Materiales necesarios pero no suministrados

| | |
|--|---|
| Kit de purificación | ■ QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi) (n.º de referencia 937055) |
| Adaptadores para el instrumento QIASymphony SP | <ul style="list-style-type: none"> ■ Elution Microtube Rack QS (gradilla para microtubos de elución QS) (adaptador de refrigeración, EMT, v2, Qsym, n.º de referencia 9020730) ■ Tube Insert 3B (inserto para tubos 3B) (inserto, 2,0 ml v2, soporte para muestras [24], Qsym, n.º de referencia 9242083) |
| Consumibles para el instrumento QIASymphony SP | <ul style="list-style-type: none"> ■ Sample Prep Cartridges, 8-well (cartuchos de preparación de muestras, 8 pocillos) (n.º de referencia 997002) ■ 8-Rod Covers (cubiertas para 8 barras) (n.º de referencia 997004) ■ Filter-Tips, 1.500 µl (puntas con filtro, 1.500 µl) (n.º de referencia 997024) ■ Filter-Tips, 200 µl (puntas con filtro, 200 µl) (n.º de referencia 990332) ■ Elution Microtubes CL (microtubos de elución CL) (n.º de referencia 19588) ■ Tip disposal bags (bolsas para la eliminación de puntas) (n.º de referencia 9013395) ■ Micro tubes 2.0 ml Type H (microtubos de 2,0 ml de tipo H) o Micro tubes 2.0 ml Type I (microtubos de 2,0 ml de tipo I) (Sarstedt, n.º de referencia 72.693 y 72.694, www.sarstedt.com) para uso con muestras y controles internos |
| Adaptadores y soportes para reactivos para el instrumento QIASymphony AS | <ul style="list-style-type: none"> ■ Reagent holder 1 QS (soporte para reactivos 1 QS) (adaptador de refrigeración, soporte para reactivos 1, Qsym, n.º de referencia 9018090) ■ Reagent holder 2 QS (soporte para reactivos 2 QS) (adaptador de refrigeración, soporte para reactivos 2, Qsym, n.º de referencia 9018089) ■ RG Strip Tubes 72 QS (tubos en tira RG 72 QS) (adaptador de refrigeración, tubos en tira RG 72, Qsym, n.º de referencia 9018092) |
| Consumibles para el instrumento QIASymphony AS | <ul style="list-style-type: none"> ■ Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (tubos en tira y tapones, 0,1 ml) (n.º de referencia 981103) ■ Tubes, conical, 2 ml, Qsym AS (tubos cónicos, 2 ml, Qsym AS) (n.º de referencia 997102)* o Micro tubes 2.0 ml Type I (microtubos de 2,0 ml de tipo I) (Sarstedt, n.º de referencia 72.694.005) ■ Tube, conical, 5 ml, Qsym AS (tubos cónicos, 5 ml, Qsym AS) (ref. 997104)* o Tubes with flat base from PP (tubos de fondo plano de PP) (Sarstedt, n.º de referencia 60.558.001) ■ Reagent Bottles, 30 ml, Qsym AS (frascos de reactivos, 30 ml, Qsym AS) (n.º de referencia 997108) ■ Elution Microtubes CL (microtubos de elución CL) (n.º de referencia 19588) ■ Filter-Tips, 1.500 µl (puntas con filtro, 1.500 µl) (n.º de referencia 997024) ■ Filter-Tips, 200 µl (puntas con filtro, 200 µl) (n.º de referencia 990332) ■ Filter-Tips, 50 µl (puntas con filtro, 50 µl) (n.º de referencia 997120) ■ Tip disposal bags (bolsas para la eliminación de puntas) (n.º de referencia 9013395) |

* Consulte la disponibilidad.

Manipulación y almacenamiento de las muestras

Recogida de las muestras de sangre

Muestra de sangre

5–10 ml de sangre con EDTA

Mezcla superior (x 8), sin agitación

No deben usarse muestras humanas heparinizadas.

Almacenamiento de las muestras

Separación: 20 minutos de centrifugación, 800–1.600 x g en las 24 horas siguientes a la recogida.

Transferir el plasma aislado a un tubo de polipropileno estéril.

La sensibilidad del ensayo puede verse reducida si se congelan las muestras de forma sistemática o si se almacenan durante un período de tiempo mayor.

ADN encapsulado del virus estable a*:

4 °C días

–20 °C semanas

–70 °C meses

Transporte de las muestras

Transporte irrompible

Envío en un plazo de 24 horas.

Envío por correo conforme a la normativa legal para el transporte de materiales patógenos.

Las muestras de sangre deben enviarse refrigeradas (entre 2 y 8 °C).

Sustancias causantes de interferencias

La heparina (≥ 10 UI/ml) afecta a la PCR. No deben usarse muestras recogidas en tubos que contienen heparina como anticoagulante ni muestras de pacientes heparinizados.

Preparación de las muestras

Evite la formación de espuma en el interior o en la superficie de las muestras.†

Las muestras deben equilibrarse a temperatura ambiente (15–25 °C) antes de comenzar la serie analítica.

* Arbeitskreis Blut, V17 (09.1997), Bundesgesundheitsblatt 11/1997, p. 452–456.

† International Air Transport Association (IATA, Asociación Internacional de Transporte Aéreo). Dangerous Goods Regulations (Normativa sobre mercancías peligrosas).

Procedimiento

Preparación del ARN transportador y adición del control interno a las muestras

El uso del kit QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi en combinación con el kit *artus* HBV QS-RGQ requiere la introducción del control interno (HBV RG/TM IC) en el procedimiento de purificación para vigilar la eficiencia de la preparación de las muestras y del ensayo anterógrado.

Es preciso añadir controles internos con la mezcla ARN transportador (CARRIER) – tampón AVE (AVE), y el volumen total de la mezcla control interno – ARN transportador (CARRIER) – tampón AVE (AVE) sigue siendo de 120 μ l.

La tabla representa la adición del control interno al aislado en una razón de 0,1 μ l por 1 μ l de volumen de elución. Recomendamos preparar mezclas frescas para cada serie analítica justo antes del uso.

| Componente | Volumen (μ l) (tubos Sarstedt®)* | Volumen (μ l) (tubos BD™)† |
|---|---------------------------------------|---------------------------------|
| ARN transportador (CARRIER) de partida | 5 | 5 |
| Control interno‡ | 9 | 9 |
| Tampón AVE | 106 | 106 |
| Volumen final por muestra (excluido el volumen muerto) | 120 | 120 |
| Volumen total para n muestras | (n x 120) + 360§ | (n x 120) + 600¶ |

* Microtubos de 2,0 ml de tipo H y microtubos de 2,0 ml de tipo I (Sarstedt, n.º de referencia 72.693 y 72.694).

† Tubos de poliestireno de 14 ml, 17 x 100 mm y fondo redondeado (Becton Dickinson, n.º de referencia 352051).

‡ El cálculo de la cantidad de control interno se basa en los volúmenes de elución iniciales (90 μ l). El volumen vacío adicional depende del tipo de tubo de muestras usado.

§ Se requiere una mezcla de control interno correspondiente a 3 muestras adicionales (es decir, 360 μ l). No debe superarse un volumen total de llenado de 1,92 ml (que corresponde a un máximo de 13 muestras; Estos volúmenes son específicos para microtubos de 2,0 ml de tipo H y microtubos de 2,0 ml de tipo I [Sarstedt, n.º de referencia 72.693 y 72.694]).

¶ Se requiere una mezcla de control interno correspondiente a 5 muestras adicionales (es decir, 600 μ l). No debe superarse un volumen total de llenado de 13,92 ml (que corresponde a un máximo de 111 muestras; estos volúmenes son específicos para tubos de poliestireno de 14 ml, 17 x 100 mm y fondo redondeado [Becton Dickinson, n.º de referencia 352051]).

Preparación del instrumento QIA Symphony SP

Cajón "Waste" (desechos)

| | |
|---|--|
| Soporte de caja unitaria 1–4 | Cajas unitarias vacías |
| Soporte de la bolsa de desechos | Bolsa de desechos |
| Soporte para frasco de desechos líquidos | Vacíe e instale el frasco de desechos líquidos |

Cajón "Eluate" (eluidos)

| | |
|----------------------------|--|
| Gradilla de elución | Utilice la ranura 1, posición de refrigeración |
| Volumen de elución* | Volumen de elución preseleccionado: 60 μ l Volumen de elución inicial: 90 μ l |

* El volumen de elución se preselecciona para el protocolo. Se trata del volumen accesible mínimo de eluido presente en el tubo de elución final. Se requiere el volumen inicial de solución de elución para garantizar que el volumen real de eluido sea el mismo que el volumen preseleccionado.

Cajón "Reagents and Consumables" (reactivos y consumibles)

| | |
|--|---|
| RC, posiciones 1 y 2 | Cargue 1 cartucho de reactivos (RC) para un máximo de 48 muestras o 2 cartuchos de reactivos (RC) nuevos para un máximo de 96 muestras. |
| Soporte de gradillas de puntas, posiciones 1–18 | Cargue suficientes gradillas de puntas con filtro desechables, de 200 μ l y 1.500 μ l (consulte "Material de plástico necesario para 1–4 lotes de muestras", página 7). |
| Soporte de caja unitaria, posición 1–4 | Cargue cajas unitarias que contienen cartuchos de preparación de muestras o cubiertas para 8 barras (consulte "Material de plástico necesario para 1–4 lotes de muestras", página 7). |

Cajón "Sample" (muestras)

| | |
|---|---|
| Tipo de muestra | Plasma |
| Volumen de la muestra (incluido el volumen sobrante) | 1.200 μ l |
| Tubos de muestras | Microtubos de 2,0 ml de tipo H o microtubos de 2,0 ml de tipo I (Sarstedt, n.º de referencia 72.693 y 72.694) |
| Inserto | Inserto para tubos 3B (n.º de referencia 9242083) |

Material de plástico necesario para 1–4 lotes de muestras

| | Un lote, 24 muestras* | Dos lotes, 48 muestras* | Tres lotes, 72 muestras* | Cuatro lotes, 96 muestras* |
|--|------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Puntas con filtro desechables, 200 μl^{†‡} | 28 | 52 | 76 | 100 |
| Puntas con filtro desechables, 1.500 μl^{†‡} | 113 | 206 | 309 | 402 |
| Cartuchos de preparación de muestras[§] | 21 | 42 | 54 | 72 |
| Cubiertas para 8 barras[¶] | 3 | 6 | 9 | 12 |

* El uso de más de un tubo de control interno por lote y la realización de más de un examen de inventario requieren puntas con filtro desechables adicionales.

† Hay 32 puntas con filtro por gradilla de puntas.

‡ El número de puntas con filtro necesarias incluye las puntas con filtro para 1 examen de inventario por cartucho de reactivos.

§ Hay 28 cartuchos de preparación de muestras por caja unitaria.

¶ Hay doce cubiertas para 8 barras por caja unitaria.

Preparación del instrumento QIASymphony AS

Consumibles

Durante la preparación, se indican en la pantalla táctil del instrumento las posiciones apropiadas para cada consumible en el módulo QIASymphony AS.

| Consumibles | Nombre que aparece en la pantalla táctil | Para uso con adaptador/soporte para reactivos |
|---|--|--|
| Tubos en tira y tapones, 0,1 ml (250) | QIA#981103 *StripTubes 0.1 | Tubos en tira RG 72 QS |
| Tubos cónicos, 2 ml, Qsym AS (500)*† | QIA#997102 *T2.0 ScrewSkirt‡ | Soporte para reactivos 1 QS Soporte para reactivos 2 QS |
| Tubo cónico, 5 ml, Qsym AS (500)*† | QIA#997104 *T5.0 ScrewSkirt‡ | Soporte para reactivos 1 QS Soporte para reactivos 2 QS |
| Fascos de reactivos, 30 ml, Qsym AS (50)* | QIA#997108 *Bottle 30ml‡ | Soporte para reactivos 2 QS |
| Microtubos de elución CL (24 x 96) | QIA#19588 * EMTR | Gradilla para microtubos de elución QS |

* Para los componentes de la mezcla maestra, la mezcla maestra preparada por el sistema, los estándares del ensayo y los controles del ensayo.

† También pueden utilizarse los tubos Sarstedt descritos en "Materiales necesarios pero no suministrados", página 2.

‡ El sufijo "(m)" que aparece en la pantalla táctil indica que los cálculos del nivel de líquido del tubo en cuestión se han optimizado para reactivos que forman un menisco cóncavo.

Adaptadores y soportes para reactivos

| Gradilla/soporte para reactivos | Nombre | Número necesario [§] |
|---------------------------------|--|-------------------------------|
| Gradilla de muestras | Gradilla para microtubos de elución QS | 1 |
| Soportes para reactivos | Soporte para reactivos 1 QS | 1 |
| Gradillas de ensayo | Tubos en tira RG 72 QS | 1 |

[§] Calculado para una serie analítica de ensayo con 72 reacciones.

Puntas con filtro

Cargue las gradillas de puntas comenzando por las ranuras de puntas 1, 2 y 3 en el cajón "Eluate and Reagents" (eluidos y reactivos) y, a continuación, cargue las gradillas de puntas en las ranuras de puntas 7, 8 y 9 en el cajón "Assays" (ensayos).

| Consumible | Nombre que aparece en la pantalla táctil | Número mínimo para 24 reacciones | Número mínimo para 72 reacciones |
|--|--|----------------------------------|----------------------------------|
| Puntas con filtro, 1.500 μ l (1.024) | 1.500 μ l | 4 | 5 |
| Puntas con filtro, 200 μ l (1.024) | 200 μ l | 9 | 8 |
| Puntas con filtro, 50 μ l (1.024) | 50 μ l | 25 | 73 |
| Bolsas para eliminación de puntas | – | 1 | 1 |

RT-PCR en el instrumento Rotor-Gene Q

Consulte la hoja de protocolo específica del software "Settings to run *artus* QS-RGQ Kits" (valores de configuración para procesar kits *artus* QS-RGQ) en www.qiagen.com/products/artushbvpcrkitce.aspx.

Valores de configuración específicos para el kit *artus* HBV QS-RGQ

Rotor-Gene AssayManager configura automáticamente los parámetros para el kit *artus* HBV QS-RGQ.

A continuación se muestran los valores de configuración específicos para la versión 2.1 del software Rotor-Gene.

| | |
|--|--|
| Volumen de reacción (µl) | 50 |
| En espera | Temperatura en espera: 95 °C Tiempo en espera: 10 min |
| Ciclado | 45 veces 95 °C durante 15 s 55 °C durante 30 s 72 °C durante 15 s |
| Configuración de optimización de autogancia | 55 °C (muestras: verde; IC: amarillo) |

Interpretación de los resultados

En este apartado se describe la interpretación de los resultados en el instrumento Rotor-Gene Q. Revise también la información sobre el estado de las muestras en los archivos de resultados de los instrumentos QIASymphony SP/AS para el análisis del flujo de trabajo completo desde la muestra hasta el resultado. Únicamente deben utilizarse muestras con un estado válido.

Rotor-Gene AssayManager interpreta automáticamente los resultados de la PCR y proporciona una conclusión y un resultado cuantitativo.

En los siguientes apartados se describe la interpretación de los resultados con el software Rotor-Gene, versión 2.1 o superior.

Detección de la señal y conclusiones

| Señal en el canal Cycling Green | Señal en el canal Cycling Yellow | Resultado cuantitativo (UI/ml) | Interpretación |
|---------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|--|
| Sí | Sí | < 10,22 | Resultado válido: Se ha detectado ADN de VHB, < 31,6 UI/ml. No es posible la cuantificación dado que el resultado cuantitativo se encuentra por debajo del límite de detección. La reproducibilidad del resultado positivo no está asegurada. |
| Sí | Sí | $\geq 10,22$ y < 31,6 | Resultado válido: Se ha detectado ADN de VHB, < 31,6 UI/ml. No es posible la cuantificación dado que el resultado cuantitativo se encuentra por debajo del intervalo lineal del ensayo. |
| Sí | Sí | $\geq 31,6$ y $\leq 2 \times 10^7$ | Resultado válido: Se ha detectado ADN de VHB en la concentración calculada. El resultado cuantitativo se encuentra dentro del intervalo lineal del ensayo. |
| Sí | Sí | $> 2 \times 10^7$ | Resultado válido: Se ha detectado ADN de VHB, $> 2 \times 10^7$ UI/ml. No es posible la cuantificación dado que el resultado cuantitativo se encuentra por encima del intervalo lineal del ensayo*. |
| No | Sí | – | Resultado válido: No hay ADN de VHB detectable.† |
| No | No | – | Resultado no válido: No puede obtenerse un resultado.‡ |

* Si se desea una cuantificación, diluya la muestra con plasma sin VHB y repita el procesamiento. Multiplique el resultado cuantitativo de la muestra reprocesada por el factor de dilución.

† Si el valor C_T para el control interno de una muestra negativa es más de 3 ciclos mayor que el valor C_T para el control interno del control sin molde (NTC) de la serie analítica ($C_{TIC\ Muestra} - C_{TIC\ NTC} > 3$), la muestra deberá tratarse como no válida. No puede obtenerse un resultado.

‡ Puede encontrar información sobre las fuentes de errores y su solución en el apartado "Guía para la resolución de problemas" del *Manual del kit artus HBV QS-RGQ*.

Configuración del umbral para el análisis de PCR

La configuración óptima del umbral para una combinación dada de instrumento Rotor-Gene Q y kit *artus* QS-RGQ debe establecerse de manera empírica probando las distintas combinaciones, ya que se trata de un valor relativo que depende del flujo de trabajo diagnóstico global. Puede establecerse un valor preliminar de 0,04 para el análisis de la primera serie de PCR. Sin embargo, este valor deberá afinarse en un análisis comparativo de las siguientes series del flujo de trabajo. El umbral debe ajustarse manualmente, justo por encima de la señal de fondo de los controles negativos y de las muestras negativas. La media del valor umbral que se obtenga de estos experimentos muy probablemente funcionará para la mayoría de las series analíticas que se vayan a realizar. No obstante, el usuario deberá revisar a intervalos periódicos el valor umbral generado. Por regla general, el valor umbral oscilará entre 0,03 y 0,05. Este deberá redondearse para no exceder los 3 decimales.

Cuantificación

Los estándares de cuantificación (HBV RG/TM QS 1–5) del kit *artus* HBV QS-RGQ se tratan como muestras previamente purificadas y se utiliza el mismo volumen (20 µl). Para generar una curva de estándares con los instrumentos Rotor-Gene Q, los 5 estándares de cuantificación deben utilizarse y definirse en el cuadro de diálogo “Edit Samples” (editar muestras) del instrumento Rotor-Gene Q como estándares con las concentraciones especificadas (consulte el manual del usuario del instrumento).

Nota: Los estándares de cuantificación se definen como UI/µl*. Debe aplicarse la siguiente ecuación para convertir los valores determinados utilizando la curva de estándares en UI/ml de material de muestra:

$$\text{Resultado (UI/ml)} = \frac{\text{Resultado (UI/}\mu\text{l)} \times \text{Volumen de elución inicial (90 }\mu\text{l)}^\dagger}{\text{Volumen de muestra (ml)}}$$

Como norma, el volumen de muestra inicial debe incluirse en la ecuación anterior. Esto debe tenerse en cuenta cuando se ha cambiado el volumen de muestra antes de la extracción de ácidos nucleicos (p. ej., reduciendo el volumen mediante centrifugación o aumentando el volumen mediante adición hasta el volumen necesario para el aislado).

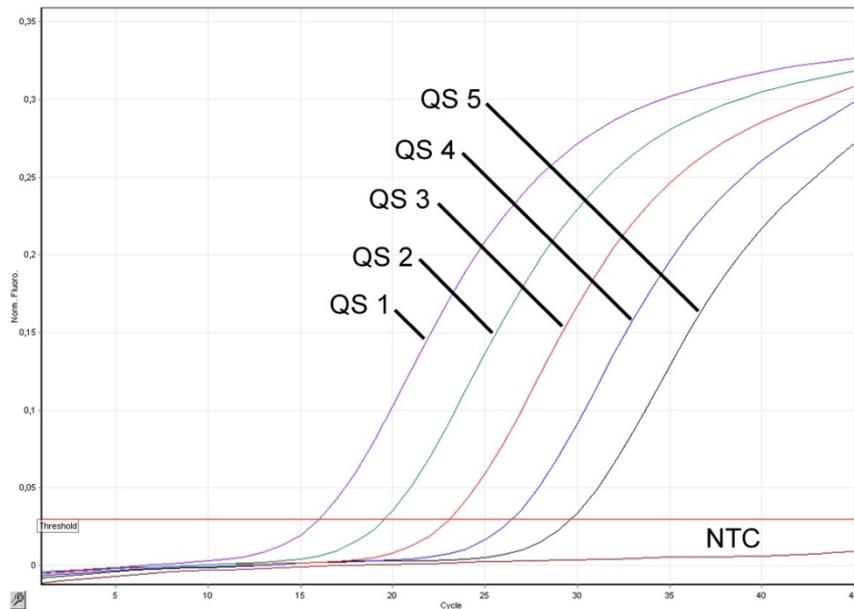
Factor de conversión

1 UI/ml corresponde a 8,21 copias/ml para la detección de ADN de VHB en el instrumento Rotor-Gene Q. El factor de conversión es una aproximación basada en un factor promedio en el intervalo dinámico del ensayo.

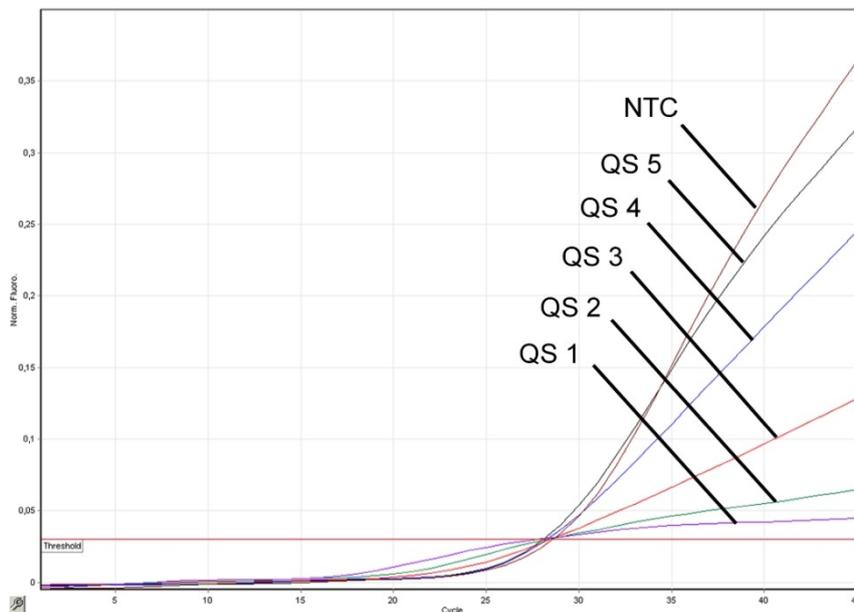
* El estándar se ha calibrado utilizando el estándar internacional para el VHB (OMS).

† El cálculo se basa en los volúmenes de elución iniciales (90 µl).

Ejemplos de reacciones de PCR positivas y negativas



Detección de los estándares de cuantificación (HBV RG/TM QS 1-5) en el canal de fluorescencia Cycling Green. NTC: control sin molde (control negativo).



Detección del control interno (IC) en el canal de fluorescencia Cycling Yellow con amplificación simultánea de los estándares de cuantificación (HBV RG/TM QS 1-5). NTC: control sin molde (control negativo).

Si desea obtener información actualizada sobre la licencia y las exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o la guía del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse al Servicio Técnico de QIAGEN o a su distribuidor local.

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

© 2012 QIAGEN. Reservados todos los derechos.

www.qiagen.com

Canada = 800-572-9613

Ireland = 1800 555 049

Norway = 800-18859

China = 021-3865-3865

Italy = 800-787980

Singapore = 65-67775366

Denmark = 80-885945

Japan = 03-6890-7300

Spain = 91-630-7050

Australia = 1-800-243-800

Finland = 0800-914416

Korea (South) = 1544 7145

Sweden = 020-790282

Austria = 0800/281010

France = 01-60-920-930

Luxembourg = 8002 2076

Switzerland = 055-254-22-11

Belgium = 0800-79612

Germany = 02103-29-12000

Mexico = 01-800-7742-639

UK = 01293-422-911

Brazil = 0800-557779

Hong Kong = 800 933 965

The Netherlands = 0800 0229592

USA = 800-426-8157



Sample & Assay Technologies