Setembro 2017

Folha de Aplicação do QIAsymphony® RGQ

Kit *artus®* EBV QS-RGQ (tipo de amostra: sangue)



CE

REF

4501363PT-BR Kit artus EBV QS-RGQ, versão 1.



Verifique a disponibilidade das novas revisões de rotulagem eletrônica em www.qiagen.com/products/artusebvpcrkitce.aspx antes da execução do teste.



Informações gerais

Kit	_{Kit} artus EBV QS-RGQ, versão 1 (n° de catálogo 4501363)
Material de amostra validado	Sangue total EDTA humano
Purificação frontal	Mini Kit QIAsymphony DSP DNA (n° de catálogo 937236)
Volume da amostra (incluindo o excesso de volume)	300 µl
Conjunto de parâmetros do ensaio	artus_EBV_blood200_V4 MA_artus_EBV_blood200_V4*
Conjunto padrão de controle de teste	VirusBlood200_V5_DSP_artus_EBV
Volume de eluição	60 µl
Versão de software necessária	Versão 4.0 ou superior
Volume da mistura master	30 µl
Volume do modelo	20 µl
Número de reações	6-24
Tempo de execução no módulo AS	Para 6 reações: aproximadamente 9 minutos Para 72 reações: aproximadamente 35 minutos

* Protocolo para execução de vários ensaios com o Kit *artus* CMV QS-RGQ para carregar o CMV RG IC para o processo de purificação e configuração do ensaio.

Materiais necessários mas não fornecidos

Kit de purificação

• Mini Kit QIAsymphony DSP DNA (n° de catálogo 937236)

Adaptadores para o QIAsymphony SP

 Elution Microtube Rack QS (adaptador de resfriamento, EMT, v2, Qsym, n° de catálogo 9020730)

- Quadro de transferência
- Tube Insert 3B (inserto, 2,0ml v2, samplecarr. (24), Qsym, n° de catálogo 9242083)

Itens de consumo para o QIAsymphony SP

- Sample Prep Cartridges, 8-well (Cartuchos de preparação de amostra, 8 poços) (n° de catálogo 997002)
- 8-Rod Covers (Tampas de 8 hastes) (n° de catálogo 997004)
- Filter-Tips (Ponteiras de filtro), 1500 µl (n° de catálogo 997024)
- Filter-Tips (Ponteiras de filtro), 200 µl (n° de catálogo 990332)
- Elution Microtubes CL (Microtubos de eluição CL) (n° de catálogo 19588)
- Tip disposal bags (Bolsas de descarte de pontas) (n° de catálogo 9013395)
- Microtubos 2,0 ml tipo H ou microtubos 2,0 ml tipo I (Sarstedt[®], n° de catálogo 72.693 e 72.694, www.sarstedt.com) para uso com amostras e controles internos

Adaptadores e suportes de reagente para o QIAsymphony AS

- Suporte de reagente 1 QS (adaptador de resfriamento, suporte de reagentes 1, Qsym, n° de catálogo 9018090)
- Tubos de faixas RG 72 QS (adaptador de resfriamento, tubos de faixas RG 72, Qsym, n° de catálogo 9018092)

Itens de consumo para o QIAsymphony AS

- Strip Tubes and Caps (Tubos de faixas e tampas), 0,1 ml (981103)
- Tubos, cônico, 2 ml, Qsym AS (n° de catálogo 997102) ou microtubos 2,0 ml tipo l (Sarstedt, n° de catálogo 72.694.005)
- Possivelmente: Tubos, cônico, 5 ml, Qsym AS (n° de catálogo 997104) ou tubos com base chata de PP (Sarstedt, n° de catálogo 60.558.001)
- Filter-Tips (Ponteiras de filtro), 1500 µl (n° de catálogo 997024)
- Filter-Tips (Ponteiras de filtro), 200 µl (n° de catálogo 990332)
- Filter-Tips (Ponteiras de filtro), 50 µl (n° de catálogo 997120)
- Tip disposal bags (Bolsas de descarte de pontas) (n° de catálogo 9013395)

Armazenamento e manuseio de amostras

Coleta de amostra	Amostra de sangue Sangue EDTA 5–10 ml Mistura superior 8x — sem agitar! Amostras humanas heparinizadas não devem ser usadas.
Armazenamento das amostras	Transferência para um tubo de polipropileno esterilizado A sensibilidade do teste pode ser reduzida se as amostras estiverem congeladas por uma questão de rotina ou se estiverem armazenadas por um período de tempo maior que 24 horas.
Transporte das amostras	Transporte à prova de estilhaçamento Envio dentro de 24 horas Envio por correio de acordo com as instruções legais de transporte de material patogênico* As amostras de sangue devem ser enviadas resfriadas (2 a 8 °C)
Substâncias interferentes	Heparina (≥10 IU/ml) afeta o PCR. As amostras coletadas nos tubos contendo heparina como anticoagulante ou amostras de pacientes heparinizados não devem ser usadas.
Preparação da amostra	Evite a formação de espuma nas amostras ou sobre elas As amostras devem ser equilibradas em temperatura ambiente (15–25 °C) antes de iniciar a execução.

* Associação Internacional de Transporte Aéreo (IATA). Regulamentos para Mercadorias Perigosas.

Procedimento

Adição do controle interno às amostras

O uso do Mini Kit QIAsymphony DSP DNA em combinação com o Kit *artus* EBV QS-RGQ exige a introdução do controle interno (EBV RG IC) no procedimento de purificação para monitorar a eficiência da preparação da amostra e o ensaio downstream.

Para uma execução de vários ensaios em que ambos o EBV e o CMV entrarão em um ensaio com o mesmo PCR, certifique-se de que o CMV RG IC, do Kit *artus* CMV QS-RGQ, seja usado no processo de purificação. Use um CMV RG IC do mesmo lote para a preparação da amostra e para a configuração do ensaio dos controles de PCR. Não use um CMV RG IC com um número de lote diferente.

Controles internos devem ser adicionados ao tampãoATE (ATE), e o volume total da mistura de controle interno e tampão ATE (ATE)permanece sendo 60 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. Recomendamos o preparo de misturas frescas para cada execução logo antes do uso.

Como opção, é possível usar a ferramenta "Calculadora de IC" no QIAsymphony Management Console.

Componente	Volume (µl) (tubos Sarstedt)*	Volume (μl) (tubos Corning)†
Controle interno [‡]	9	9
Tampão ATE	51	51
Volume final por amostra (exceto volume morto)	120	120
Volume total para n amostras	(n x 60) + 360§	(n x 60) + 600¶

* Microtubos 2,0 ml tipo H e microtubos 2,0 ml tipo I, Sarstedt, n° de catálogo 72.693 e 72.694.

[†] Tubos 14 ml, 17 x 100 mm com fundo redondo de poliestireno (Corning[®] Inc., n° de catálogo 352051; Becton Dickinson era a fornecedora desse tubo antes e agora a Corning Inc. é a nova fornecedora).

[‡] O cálculo do valor do controle interno baseia-se nos volumes de eluição iniciais (90 µl). O volume nulo adicional depende do tipo de tubo de amostra usado.

§ A mistura de controle interno correspondente a 6 amostras adicionais (por exemplo, 360 µl) é obrigatória. Não encha mais do que o volume total de 1,92 ml (correspondente ao máximo de 13 amostras. Esses volumes são específicos para microtubos 2,0 ml tipo H ou microtubos 2,0 ml tipo I, Sarstedt, n° de catálogo 72.693 e 72.694).

[¶] A mistura de controle interno correspondente a 10 amostras adicionais (por exemplo, 600 μl) é obrigatória. Não encha mais do que o volume total de 13,92 ml (correspondente ao máximo de 111 amostras. Esses volumes são específicos para tubos 14 ml, 17 x 100 mm com fundo redondo de poliestireno (Corning® Inc., n° de catálogo 352051; Becton Dickinson era a fornecedora desse tubo antes e agora a Corning Inc. é a nova fornecedora).

Configuração do QIAsymphony SP

Gaveta "Waste" (Resíduos)

Suporte de caixa unitárias, 1–4	Caixas unitárias vazias
Suporte de saco de resíduos	Saco de resíduos
Suporte de recipiente de resíduos líquidos	Esvazie e instale o recipiente de resíduos líquidos

Gaveta "Eluate" (Eluato)

Rack de eluição	Eluição dos microtubos CL no Elution Microtube Rack QS e no quadro de transferência
	Use o slot 1, posição de resfriamento
Volume de eluição*	Volume de eluição pré-selecionado: 60 µl Volume de eluição inicial: 90 µl

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

Gaveta "Reagents and Consumables" (Reagentes e materiais de consumo)

Posições de RC 1 e 2	Carregue 1 cartucho de reagente (RC) com até 96 amostras ou 2 novos cartuchos de reagente (RC) com até 192 amostras.
Posições 1–18 do rack para ponteiras	Carregue a quantidade suficiente de racks de ponteiras de filtro descartáveis, 200 µl e 1500 µl (consulte "Materiais de plástico necessários para lotes de amostras 1–4", página 7)
Posição 1–4 do suporte de caixa unitária	Carregue as caixas unitárias contendo cartuchos de preparo de amostra e tampas de 8 hastes (consulta "Materiais de plástico necessários para lotes de amostras 1–4", página 7)

Gaveta "Sample" (Amostra)

Tipo de amostra	Sangue total EDTA humano
Volume da amostra (incluindo o excesso de volume)	300 µl
Tubos de amostra	Microtubos 2,0 ml tipo H ou microtubos 2,0 ml tipo I (Sarstedt, n° de catálogo 72,693 e 72,694)
Introdutor	Tube Insert 3B (Inserto do tubo 3B) (n° de catálogo 9242083)

Materiais de plástico necessários para lotes de amostras 1-4

Componente	Um lote, 24 amostras*	Dois lotes, 48 amostras*	Três lotes, 72 amostras*	Quatro lotes, 96 amostras*
Ponteiras de filtro descartáveis, 200 µl†‡	26	50	74	98
Ponteiras de filtro descartáveis, 1500 µl†‡	98	188	278	368
Cartuchos de preparo de amostra§	21	42	63	84
Tampas de 8 hastes¶	3	6	9	12

* O uso de mais de um tubo de controle interno por lote e a execução de mais de uma inventariação exigem ponteiras de filtro descartáveis adicionais.

[†] Há 32 ponteiras de filtro/rack de ponteiras.

[‡] O número necessário de ponteiras com filtro inclui as ponteiras com filtro para 1 inventariação (leitura de conteúdo).

[§] Há 28 cartuchos de preparo de amostra por caixa unitária.

[¶] Há doze tampas de 8 hastes por caixa unitária.

Configuração do QIAsymphony AS

Consumíveis

Durante a configuração, as posições apropriadas para cada item de consumo no módulo QIAsymphony AS são indicadas na tela sensível ao toque do instrumento.

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

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

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

[‡] Como opção, é possível usar os tubos Sarstedt descritos em "Materiais necessários mas não fornecidos", página 2.

§ O sufixo "(m)" na tela sensível ao toque indica que os cálculos de nível de líquido para o respectivo tubo foram otimizados para os reagentes, formando um menisco côncavo.

Adaptadores e suportes de reagente

Suporte de reagente/rack	Nome	Número necessário¶
Suportes de reagente	Reagent holder 1 QS	1
Racks de amostra	RG Strip Tubes 72 QS	1

¶ Calculado para uma execução de ensaio com 72 reações.

Ponteiras de filtro

Carregar as bandejas de pontas começando pelos slots de pontas 1, 2 e 3 na gaveta "Eluate and Reagents" (Eluição e reagentes), e depois carregar as bandejas de pontas nos slots 7, 8 e 9 na gaveta "Assays" (Ensaios).

Consumíveis	Nome na tela sensível ao toque	Número mínimo para 24 reações	Número mínimo para 72 reações
Filter-Tips, 1500 µl (1024)	1500 µl	4	6
Filter-Tips, 200 µl (1024)	200 µl	10	9
Filter-Tips, 50 µl (1024)	50 µl	25	73
Bolsas de descarte de ponteiras	-	1	1

PCR no Rotor-Gene Q*

Consulte a folha de protocolo específico do software *Configurações para executar os Kits* artus QS-RGQ em **www.qiagen.com/products/artusebvpcrkitce.aspx** para saber mais sobre o protocolo.

Configurações específicas para o Kit artus EBV QS-RGQ

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

Volume de reação (µl)	50
Espera	Temperatura de espera: 95 graus Tempo de espera 10 minutos
Ciclagem	45 vezes 95 graus por 15 segundos 65 graus por 30 segundos (adquirir em verde, amarelo e função de toque de ativar para 10 ciclos) 72 graus por 20 segundos
Configuração de otimização de ganho automático	65 graus (amostras: verde; IC: amarelo)

Execução de vários ensaios

A faixa de detecção dos canais de fluorescência tem que ser determinada de acordo com as intensidades de fluorescência nos tubos de PCR. Clique em **Gain Optimisation** (otimização de ganho) na caixa de diálogo **New Run Wizard** (assistente de nova execução) para abrir a caixa de diálogo **Auto-Gain Optimisation Setup** (configuração de otimização de ganho automático) (consulta a Etapa 6 e a Figura 7 na folha de protocolo *Configurações para executar os Kits artus QS-RGQ*).

Para uma única execução de ensaio, ajuste a temperatura de calibração para **65** para corresponder à temperatura de hibridização do programa de amplificação. Para uma execução de vários ensaios que incluirão ambos o EBV e o CMV, ajuste a intensidade do canal de fluorescência manualmente.

^{*} Caso aplicável, o instrumento Rotor-Gene Q 5plex HRM com data de fabricação de janeiro de 2010 ou posterior. A data de fabricação pode ser consultada pelo número de série na parte traseira do instrumento. O número de série está no formato "mmaannn", em que "mm" indica o mês de produção, "aa" indica os últimos dois algarismos do ano de produção e "nnn" indica o identificador exclusivo do equipamento.

1. Clique em Edit (editar) (Figura 1) para editar os canais de fluorescência.

	Optimisation 9	Setup				×
ptimisati	ion : Auto-Gain Opti different gain le acceptable. Th chemistry you a Set temperatur mise All Opi	misation will reac vels until it finds re range of fluore are performing. e to 65 2 d timise Acquiring	d the fluoresence cone at which th escence you are legrees.	on the inse e fluorescen looking for d	rted sample a ice levels are depends on ti	at he
Perfor	rm Ontimisation Be	efore 1st Acquis	J ition			
Perfor	rm Optimisation At	65 Degrees At	Beginning Of Ru	n		
hannel 9	Settings :	_				
					•	Add
Name	Tube Position	Min Reading	Max Reading	Min Gain	Max Gain	
Name Green	Tube Position	Min Reading 5FI	Max Reading	Min Gain	Max Gain 10	Edit
Name Green Yellow	Tube Position 1 1	Min Reading 5FI 5FI	Max Reading 10FI 10FI	Min Gain -10 -10	Max Gain 10 10	Edit) Eemove Remove All
Name Green Yellow	Tube Position 1 1	Min Reading 5FI 5FI	Max Reading 10FI 10FI	Min Gain -10 -10	 Max Gain 10 10	Edit
Name Green Yellow	Tube Position 1 1	Min Reading 5FI 5FI	Max Reading 10Fl 10Fl	Min Gain -10 -10	Max Gain 10 10	Edit

Figura 1. Ajuste da intensidade do canal de fluorescência manualmente. Ajuste a intensidade de cada canal de fluorescência em diferentes posições do tubo para diferentes ensaios (CMV e EBV).

2. Configure a posição do tubo para o primeiro ensaio do *artus* (por exemplo, EBV). Configure a posição do tubo para todos os canais de fluorescência e clique em **OK** (Figura 2).



Figura 2. Configuração da posição do tubo.

 Clique em Start (iniciar) para começar a ganhar otimização para o primeiro ensaio artus (Figura 3).

		Setup				
Optimisati	ion :					
S So	Auto-Gain Optii different gain le acceptable. Th chemistry you a	misation will read evels until it finds ne range of fluor are performing.	d the fluoresence s one at which th escence you are	e on the inse le fluorescen looking for (rted sample a ice levels are depends on th	t
	Sat temperatur	ato [65] 🔟 a	10,770.00			
	Set temperatur		jegrees.			
Optin	nise All 🛛 Opt	timise Acquiring				
Perfor	m Optimisation Be	efore 1st Acquis	ition			
	O V V A					
Perfor	m Uptimisation At	: 65 Degrees At	Beginning Of Ru	In		
Channel 9	Settings :					
					•	<u>A</u> dd
Name	Tube Position	Min Reading	Max Reading	Min Gain	▼ Max Gain	<u>A</u> dd
Name Green	Tube Position	Min Reading 5FI	Max Reading 10Fl	Min Gain -10	Max Gain	<u>A</u> dd Edit
Name Green Yellow	Tube Position	Min Reading 5FI 5FI	Max Reading 10Fl 10Fl	Min Gain -10 -10	Max Gain 10 10	<u>A</u> dd <u>Edit</u> <u>B</u> emove
Name Green Yellow	Tube Position 1 1	Min Reading 5FI 5FI	Max Reading 10FI 10FI	Min Gain -10 -10	Max Gain 10 10	<u>A</u> dd <u>E</u> dit <u>R</u> emove Remove
Name Green Yellow	Tube Position 1 1	Min Reading 5FI 5FI	Max Reading 10FI 10FI	Min Gain -10 -10	▼ Max Gain 10 10	<u>A</u> dd <u>E</u> dit <u>R</u> emove Remove
Name Green Yellow	Tube Position 1 1	Min Reading 5FI 5FI	Max Reading 10FI 10FI	Min Gain -10 -10	Max Gain 10 10	<u>A</u> dd <u>E</u> dit <u>R</u> emove Remove
Name Green Yellow	Tube Position 1 1	Min Reading 5FI 5FI	Max Reading 10FI 10FI	Min Gain -10 -10	▼ <u>Max Gain</u> 10 10	<u>A</u> dd <u>E</u> dit <u>R</u> emove <i>i</i>
Name Green Yellow	Tube Position 1 1	Min Reading 5FI 5FI	Max Reading 10FI 10FI	Min Gain -10 -10	Max Gain 10 10	Add Edit <u>R</u> emove Remove /
Name Green Yellow	Tube Position 1 1	Min Reading 5FI 5FI	Max Reading 10FI 10FI	Min Gain -10 -10	Max Gain 10 10 10	Add Edit <u>R</u> emove Remove /
Name Green Yellow	Tube Position 1 1	Min Reading 5FI 5FI	Max Reading 10FI 10FI	Min Gain -10 -10	▼ Max Gain 10 10 10	Add Edit <u>R</u> emove Remove /
Name Green Yellow	Tube Position 1 1	Min Reading 5FI 5FI	Max Reading 10FI 10FI	Min Gain -10 -10	Max Gain 10 10 10 10	Add Edit <u>R</u> emove Remove

Figura 3. Início da otimização de ganho.

 Uma nova janela Running Auto-Gain Optimisation (executando a otimização de ganho automático) é aberta. Espere até que Completed (concluído) apareça nessa janela (Figura 4). Anote os valores de ganho selecionados para ambos os canais e clique em Close (fechar) (Figura 4).

Running Auto-Gain Optimisation							
Messages :							
Reading at Gain 5,33 40,05FI (Too high) Reading at Gain 2,67 13,87FI (Too high) Reading at Gain 1,22 9 16FI (In range)		100					
Gain 1,33 was selected.		80					
For channel Yellow : Looking for readings between 5FI and 10FI On tube 1 :		60					
 Reading at Gain 0 4,83FI (Too low) Reading at Gain 5,33 40,1FI (Too high) Reading at Gain 2,67 13,78FI (Too high) 		40					
Gain 1,33 was selected.		20					
Completed.	-	:14 •	02:15	02:16	02:17	02:18	02
Close		Set : 65	deg. Acl	tual : 65,0 deg	Chan : Yellov	v Gain:1	

Figura 4. Otimização de ganho concluída. Anote os valores de ganho (neste caso, 1.33 para ambos os canais de fluorescência).

- 5. Repita as etapas 1-4 para uma posição de tubo do segundo ensaio artus (por exemplo, CMV).
- 6. Clique em Edit Gain (editar ganho) para editar os valores de ganho manualmente (Figura 5).

Temperature Profile : This box displays help on elements in hove wirad. E of help on an item, hove or unouse over the tem for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings. Edit Profile Channel Setup : Channel Setup : Create New Ricen 4700rm 510nm 0 Edit. Yellow 530rm 555rm 5,33 Edit. Orange 885rm 600rm 10 Edit. Gain Optimisation Reset Defaults	New Run Wizard		×
Edit Profile Channel Setup : Channel Setup : Channel Setup : Risen 470m 510 hm 0 Yellow 530m 555mm 5,33 Orange 585mm 610nm 0 Breen 470m 510 hm 0 Create New Fdit. Profile Channel Setup : Reset Defaults Gain Optimisation		Temperature Profile :	This box displays
		Edit Profile Edit Profile Channel Setup : Name Source Detector Gain Green 470nm S10nm 0 Felix Source Pellow 530nm S03nm 558nm G10nm 0 Red 620nm Crimson 680nm Time Non Edit Gain Edit Gain Cainson 680nm Gain Optimisation Edit Optimisation	help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the tiem for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.

Figura 5. Edição manual dos valores de ganho.

7. Selecione o menor valor de ganho para Cycling Green anotado na Etapa 4 e insira esse valor manualmente na janela Gain for Green (ganho para verde) (Figura 6). Selecione o menor valor de ganho para Cycling Yellow anotado na Etapa 4 e insira esse valor manualmente na janela Gain for Yellow (ganho para amarelo) (Figura 6).



Figura 6. Inserção manual dos menores valores de ganho.

 Os valores de ganho determinados pela calibração do canal (ou atribuídos manualmente) são salvos automaticamente e são enumerados na última janela do menu do procedimento de programação (Figura 7). Clique em Start Run (iniciar execução).

New Run Wizard				
	Summay:			
00000000000000000000000000000000000000	Setting Green Gain Yellow Gain Rotor Sample Layout Reaction Volume (in microliters)	Value 4 8 72-Well Rotor 1, 2, 3, 50		
	Drice you've confirmed that your in begin the run. Click Save Templat	un settings are co e to save settings	rrect, click Start Run to for future runs.	Start Run Save Template

Figura 7. Iniciando a execução.

Interpretação dos resultados

Esta seção descreve a interpretação dos resultados do Rotor-Gene Q. Review, bem como das informações de status da amostra dos arquivos de resultado do QIAsymphony SP/AS para a análise do fluxo de trabalho completo da amostra para o resultado. Só devem ser usadas amostras com status válido.

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

Detecção de sinal e conclusões – sangue

Sinal no canal Cycling Green	Sinal no canal Cycling Yellow	Resultado quantitativo (cópias/ml)	Interpretação
Sim	Sim	<288,3	Resultado válido: EBV DNA detectado, <1000 cópias/ml.
			Quantificação não possível, dado que o resultado quantitativo está abaixo do limite de detecção. Reproduzibilidade do resultado positivo não garantida.
Sim	Sim	≥288,3 e <1000	Resultado válido: EBV DNA detectado, <1000 cópias/ml.
			Quantificação não possível, dado que o resultado quantitativo está abaixo do intervalo linear do ensaio.
Sim	Sim/Não**	≥1000 e ≤5 x 10 ⁷	Resultado válido: EBV DNA detectado na concentração calculada.
			O resultado quantitativo está dentro do intervalo linear do ensaio.
Sim	Sim/Não**	>5 x 10 ⁷	Resultado válido: EBV DNA detectado, <5 x 10 ⁷ cópias/ml.
			Quantificação não possível, dado que o resultado quantitativo está acima do intervalo linear do ensaio.*
Não	Sim	_	Resultado válido: Não há EBV DNA detectável.†
Não	Não	-	Resultado inválido: Nenhum resultado pode ser concluído.‡

* Se desejar fazer a quantificação, dilua a amostra com o sangue livre de EBV e refaça o processo. 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 mais do que 3 ciclos maiores do que o valor de C_T do controle interno do controle sem modelo no ciclo (C_{T IC amostra} - C_{T IC NTC} > 3), a amostra deve ser tratada como inválida. Nenhum resultado pode ser concluído.

[‡] As informações sobre as fontes de erro e suas soluções podem ser encontradas no "Guia de solução de problemas" do *Manual do Kit* artus *EBV QS-RGQ*.

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

Configuração de limite para a análise de PCR

As configurações ideais de limite para determinada combinação do instrumento Rotor-Gene Q e o Kit *artus* QS-RGQ devem ser empiricamente definidas testando cada combinação individual, já que é um valor relativo dependendo do fluxo de trabalho de diagnóstico geral. O limite pode ser definido como um valor preliminar de 0,04 para a análise da primeira execução de PCR, mas esse valor deve ser bem ajustado em uma análise comparativa das próximas execuções do fluxo de trabalho. O limite deve ser definido manualmente logo acima do sinal de fundo dos controles negativos e das amostras negativas. O valor médio do limite calculado nesses experimentos provavelmente funcionará para a maioria das execuções futuras, mas mesmo assim o usuário deve revisar o valor de limite gerado em intervalos regulares. O valor de limite normalmente estará entre 0,03 e 0,05, e deve ser arredondado para não mais do que três casas decimais.

Quantificação

Os padrões de quantificação (EBV QS 1–4) no Kit *artus* EBV QS-RGQ são tratados como amostras previamente purificadas e o mesmo volume é usado (20 µl). Para gerar uma curva padrão nos instrumentos Rotor-Gene Q, todos 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).

Nota: 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.

	Resultado no eluato (cópias/µl) x volume de
Resultado no material da	eluição inicial (90 µl)*
amostra (cópias/ml)	
	Volume da amostra (ml)

Por uma questão de princípio, o volume de amostra inicial deve ser inserido na equação acima. Isto tem que ser considerado quando o volume da amostra tiver sido alterado antes da extração do ácido nucleico (p. ex., diminuindo o volume por centrifugação ou aumentando o volume por reabastecimento para o volume necessário ao isolamento).

Para uma execução de vários ensaios em que tanto CMV como EBV foram incluídos no mesmo PCR, certifique-se de que amostras separadas tenham sido analisadas para CMV e EBV, com os padrões de quantificação correspondentes.

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

Fator de conversão

1 cópia/ml corresponde a 0,140 IU/ml para detecção do EBV DNA derivado do sangue total EDTA humano no Rotor-Gene Q. Este fator de conversão se aplica ao aderir ao fluxo de trabalho validado, conforme indicado nesta Folha de Aplicação. O fator de conversão é uma aproximação com base no fator médio do intervalo dinâmico do ensaio.

Exemplos de reações positivas e negativas de PCR



Detecção de padrões de quantificação (EBV QS 1-4) no canal de fluorescência Cycling Green.

NTC: Nenhum controle de modelo (controle negativo).



Detecção de controle interno (IC) no canal de fluorescência Cycling Yellow com amplificação simultânea dos padrões de quantificação (EBV QS 1–4). NTC: Nenhum controle de modelo (controle negativo).

Histórico de revisão do documento				
Setembro 2017	Informações incluídas sobre o fator de conversão (cópias para IU/ml). Remoção da nota de rodapé indicando que é possível configurar 216 ensaios em uma execução de AS Materiais necessários para alteração, para que sejam incluídos somente os materiais necessários para uma configuração de execução integrada de no máximo 72 reações no QS-SP/AS. Inclusão de informações mais detalhadas sobre o uso de materiais para execução de vários ensaios com EBV (uso de CMV IC). Informações incluídas sobre o uso do software QIAsymphony Management Console para preparo do RNA transportador e IC na seção "Procedimento". Troca do fabricante de equipamentos plásticos da BD para Corning. Esclarecimento sobre as configurações de execução de RGQ (uso da função de toque, aquisições). Inclusão das informações sobre a interpretação dos resultados para incluir casos de "patogênio positivo e IC negativo". Remoção das instruções relativas ao uso do Rotor-Gene AssayManager. Alteração dos limites de resultado quantitativo para alinhar-se aos valores do intervalo linear atualizado. Esclarecimento da diferença entre eluato e concentração de amostra no cálculo de quantificação. Aceitação da listagem de purificação de frente.			

Para informações atualizadas sobre licenciamento e isenções de garantia específicas do produto, consulte o respectivo manual do kit QIAGEN ou manual do usuário. Os manuais do Kit QIAGEN e do usuário estão disponíveis em **www.qiagen.com** ou podem ser solicitados aos Serviços técnicos ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Marcas registradas: QIAGEN®, Sample to Insight[®], QIAsymphony[®], artus[®], Rotor-Gene[®] (QIAGEN Group); BD™ (Becton, Dickinson and Company); Corning[®] (Corning Inc.); Sarstedt[®] (Sarstedt AG and Co.). Os nomes registrados, marcas registrados, etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcados especificamente como tais, não devem ser considerados como não protegidos pela lei. 09/2017 HB-0357-S01-002 © 2012-2017 QIAGEN, todos os direitos reservados

Pedido www.qiagen.com/shop | Assistência Técnica support.qiagen.com |Site www.qiagen.com