

Folha de aplicação do QIASymphony® RGQ

Aplicação QIASymphony RGQ artus® HI Virus-1 QS-RGQ Kit (tipo de amostra: plasma)

IVD

CE
0197



Verificar a disponibilidade de novas revisões de rotulagem electrónica em www.qiagen.com/products/artushivirusrp-rt-pcrkitce.aspx antes da realização do teste. O estado de revisão actual é indicado pela data de emissão (formato: mês/ano).

Informações gerais

Kit	artus HI Virus-1 QS-RGQ Kit, Versão 1, REF 4513363, 4513366
Material de amostra validado	Plasma humano tratado com EDTA
Purificação avançada	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (n.º cat. 937055)
Volume da amostra (incluindo volume excedente)	1.200 µl
Conjunto de parâmetros de ensaio	artus_HIV plasma1000_V4
Conjunto de controlo do ensaio predefinido	Cellfree1000_V6_DSP artus HIV
Volume de eluição	60 µl
Versão de software necessária	Versão 4.0 ou posterior
Volume de mistura padrão	30 µl
Volume modelo	20 µl
Número de reacções	6–24 ou 6–72*
Tempo de teste no módulo AS	Para 6 reacções: aproximadamente 9 minutos Para 72 reacções: aproximadamente 35 minutos

* Ao realizar procedimentos com vários ensaios, assegurar que o limite de 72 reacções e 1 adaptador de suporte de ensaio não é excedido. Evitar um tempo de incubação alargado (>30 minutos) entre a conclusão do procedimento de ensaio e a transferência para o Rotor-Gene®Q.



Maio 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	■	Elution Microtube Rack QS (suporte de microtubos de eluição QS) (Cooling Adapter (adaptador de arrefecimento), EMT, v2, Qsym, n.º cat. 9020730)
	■	Tube Insert 3B (introdutor de tubos 3B) (Insert (introdutor), 2,0 ml 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), 1.500 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)
	■	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) para utilização 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 (tubos em tira RG) 72 QS (Cooling Adapter (adaptador de arrefecimento), RG Strip Tubes (tubos em tira 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 (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 (microtubos de eluição CL) (n.º cat. 19588)
	■	Filter-Tips (pontas com filtro), 1.500 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)

* Verifique a disponibilidade de stocks.

Manuseamento e armazenamento de amostras

Colheita de amostras	Amostra de sangue 5–10 ml de sangue tratado com EDTA Mistura aérea 8x — não agitar! Não devem ser utilizadas amostras humanas tratadas com heparina
Armazenamento de amostras	de Separação: centrifugação durante 20 minutos, 800–1.600 x g no prazo de 24 horas após a colheita Transferência do plasma isolado para um tubo de polipropileno estéril ARN de vírus encapsulados estáveis a:*
	4 °C dias –20 °C semanas –70 °C meses
Transporte de amostras	Transporte à prova de estilhaços Envio no prazo de 24 horas Envio por correio de acordo com as instruções legais para o transporte de material patogénico† As amostras de sangue devem ser enviadas refrigeradas (2 a 8 °C)
Substâncias interferentes	A heparina (≥ 10 IU/ml) afecta a PCR. As amostras colhidas em tubos com heparina como anticoagulante ou amostras de doentes tratados com heparina não devem ser utilizadas. Elevados níveis de albumina (≤ 6 g/dl), bilirrubina (≤ 30 mg/dl), lípidos (≤ 1 g/dl triglicéridos) e amostras hemolizadas (≤ 2 g/dl hemoglobina) não influenciam o sistema.

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

† International Air Transport Association (IATA, Associação Internacional de Transporte Aéreo). Dangerous Goods Regulations (Regulamentação sobre Mercadorias Perigosas).

Procedimento

Preparação do ARN portador e adição do controlo interno às amostras

A utilização conjunta do QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit com o *artus* HI Virus-1 QS-RGQ Kit requer a introdução do controlo interno (HI Virus-1 RG IC) no procedimento de purificação para monitorizar a eficiência da preparação da amostra e ensaio downstream.

É necessário adicionar os controlos internos de acordo com a mistura ARN portador (CARRIER)-tampão AVE (AVE) e o volume total da mistura de controlo interno-ARN portador (CARRIER)-tampão AVE (AVE) permanece nos 120 μ l.

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

Componente	Volume (μ l) (tubos Sarstedt®)*	Volume (μ l) (tubos BD™)†
ARN portador de stock (CARRIER)	5	5
Controlo interno‡	9	9
Tampão AVE	106	106
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 polistireno) (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 polistireno), 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	Recomenda-se a utilização da ranhura 1, posição de arrefecimento
Volume de eluição*	Volume de eluição pré-seleccionado: 60 μ l Volume de eluição inicial: 90 μ l

* O volume de eluição é pré-seleccionado 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-seleccionado.

Bandeja "Reagents and Consumables" (reagentes e consumíveis)

RC Posição 1 e 2	Carregar 1 cartucho de reagente (RC) para um máximo de 48 amostras ou 2 cartuchos de reagentes (RC) novos para um máximo de 96 amostras
Suporte de pontas posição 1–4	Carregar suportes de pontas com filtro descartáveis suficientes, 200 μ l (ver "Material plástico necessário para 1–4 lotes de amostras", página 6)
Suporte de pontas posição 5–18	Carregar suportes de pontas com filtro descartáveis suficientes, 1.500 μ l (ver "Material plástico necessário para 1–4 lotes de amostras", página 6)
Suporte de caixa de unidades, posição 1–3	Carregar 3 caixas de unidades contendo cartuchos de preparação de amostras
Suporte de caixa de unidades, posição 4	Carregar 1 caixa de unidades contendo mangas de 8 barras

Bandeja "Sample" (amostra)

Tipo de amostra	Plasma
Volume da amostra (incluindo volume excedente)	1.200 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 μl^{‡§}	28	52	76	100
Pontas com filtro descartáveis, 1.500 μl^{‡§}	113	206	309	402
Cartuchos de preparação de amostras[¶]	21	42	54	72
Mangas de 8 barras^{**}	3	6	9	12

[†] Utilizar mais que um tubo de controlo interno por lote e efectuar mais que uma inventariação exige a utilização de pontas com filtro descartáveis adicionais.

[‡] Estão disponíveis 32 suportes de 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 o procedimento de configuração, as posições adequadas para cada consumível no módulo QIASymphony AS são apresentadas no ecrã táctil do instrumento.

Consumíveis	Nome no ecrã táctil	Para utilização com adaptador/suporte de reagente
Tiras de tubos e tampas, 0,1 ml (250)	QIA#981103 *StripTubes 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
Tubos, cónicos, 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 *Bottle 30ml‡	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.

† Em alternativa, podem ser utilizados os tubos Sarstedt descritos em “Materiais necessários, mas não fornecidos”, página 2.

‡ O sufixo “(m)” no ecrã táctil indica que os cálculos de nível do líquido para o respectivo tubo foram optimizados 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 um procedimento de ensaio com 72 reacções.

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" (ensaios) com suportes de pontas, nomeadamente as ranhuras de pontas 7, 8 e 9.

Consumível	Nome no ecrã táctil	Número mínimo para 24 reacções	Número mínimo para 72 reacções
Pontas com filtro, 1.500 µl (1024)	1.500 µl	5	6
Pontas com filtro, 200 µl (1024)	200 µl	10	10
Pontas com filtro, 50 µl (1024)	50 µl	25	73
Sacos de eliminação de pontas		1	1

RT-PCR no Rotor-Gene Q

Consultar a folha de protocolo específica do software "Settings to run artus QS-RGQ Kits" (Definições para ensaios nos artus QS-RGQ Kits) em www.qiagen.com/products/artushivirusr-t-pcrkitce.aspx.

Definições específicas para o artus HI Virus-1 QS-RGQ Kit

O Rotor-Gene AssayManager define automaticamente os parâmetros para o artus HI Virus-1 QS-RGQ Kit.

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

Volume de reacção (µl)	50
Retenção	Temperatura de retenção: 50 graus Tempo de retenção: 30 minutos
Retenção 2	Temperatura de retenção: 95 graus Tempo de retenção: 15 minutos
Cycling	50 vezes 95 graus durante 30 segundos 50 graus durante 60 segundos 72 graus durante 30 segundos
Configuração da optimização do ganho automático	50 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 procedimento desde a amostra ao resultado. Apenas devem ser utilizadas amostras com um estado válido

O Rotor-Gene AssayManager interpreta automaticamente os resultados de PCR e faculta uma conclusão e um resultado quantitativo.

As secções que se seguem descrevem a interpretação de resultados utilizando o software Rotor-Gene 2.1 ou posterior.

Detecção de sinal e conclusões

Sinal no canal Cycling Green	Sinal no canal Cycling Orange	Resultado quantitativo (IU/ml)	Interpretação
Sim	Sim	<76,4	Resultado válido: ARN do HIV-1 detectado, <100 IU/ml A quantificação não é possível dado que o resultado quantitativo se encontra abaixo do limite de detecção. A reprodutibilidade do resultado positivo não está assegurada.
Sim	Sim	$\geq 76,4$ e <100	Resultado válido: ARN do HIV-1 detectado, <100 IU/ml A quantificação não é possível dado que o resultado quantitativo se encontra abaixo do intervalo linear do ensaio.
Sim	Sim	≥ 100 e $\leq 1,00 \times 10^8$	Resultado válido: ARN do HIV-1 detectado na concentração calculada O resultado quantitativo encontra-se no intervalo linear do ensaio.
Sim	Sim	$> 1,00 \times 10^8$	Resultado válido: ARN do HIV-1 detectado, $> 1,00 \times 10^8$ A quantificação não é possível dado que o resultado quantitativo se encontra acima do intervalo linear do ensaio.*
Não	Sim		Resultado válido: ARN do HIV-1 não detectável.†
Não	Não		Resultado inválido: Não pode inferir-se qualquer resultado.‡

* Se se pretender a quantificação, diluir a amostra com plasma isento de VIH e reprocessar. Multiplicar o resultado quantitativo da amostra reprocessada pelo factor de diluição.

† Se o valor de C_T para o controlo interno de uma amostra negativa for mais do que 3 ciclos superior ao valor C_T para o controlo interno do controlo sem modelo no procedimento ($C_{T \text{ amostra IC}} - C_{T \text{ IC NTC}} > 3$), então a amostra deve ser tratada como inválida. Não pode inferir-se qualquer resultado.

‡ A informação relativa a fontes de erro e respectiva solução pode ser encontrada no "Guia de resolução de problemas" do *Manual do artus HI Virus-1 QS-RGQ Kit*.

Configuração do limite para análise por PCR

As definições de limite ideal para uma determinada combinação do instrumento Rotor-Gene Q e do *artus* QS-RGQ Kit 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 limite 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 dos procedimentos de análise seguintes do processo. 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 irão certamente funcionar para a maioria dos procedimentos de ensaio futuros, mas o utilizador deve, contudo, rever o valor limite gerado em intervalos regulares. O valor limite situar-se-á, normalmente, no intervalo de 0,03–0,05 e deve ser arredondado para não mais do que três lugares decimais.

Quantificação

Os padrões de quantificação (HI Virus-1 RG QS 1–4) do *artus* HI Virus-1 QS-RGQ Kit são tratados como amostras previamente purificadas, sendo utilizado o mesmo volume (20 µl). Para gerar uma curva standard 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 manual do utilizador do instrumento).

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

$$\text{Resultado (IU/ml)} = \frac{\text{Resultado (IU/}\mu\text{l)} \times \text{Volume de Eluição Inicial (90 }\mu\text{l)}^\dagger}{\text{Volume de amostra (ml)}}$$

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 extracção do ácido nucleico (ex.: reduzir o volume por centrifugação ou aumentar o volume adicionando ao volume necessário para o isolamento).

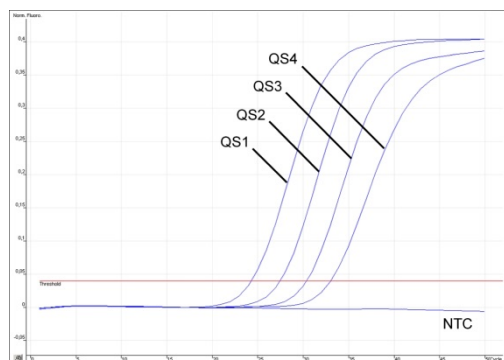
Factor de conversão

1 IU/ml corresponde a 0,45 cópias/ml para a detecção de ARN do VIH-1 no Rotor-Gene Q. O factor de conversão foi determinado por uma análise de regressão de várias séries de diluições comparada com um método de referência com resultados apresentados em cópias/ml.

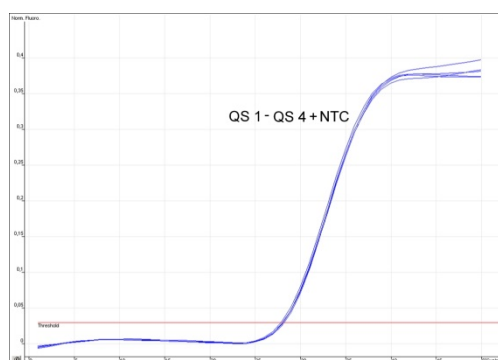
* O padrão foi calibrado utilizando o padrão internacional de VIH (OMS).

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

Exemplos de reacções de PCR positivas e negativas



Deteção dos padrões de quantificação (HI Virus-1 RG QS 1–4) no canal de fluorescência Cycling Green. NTC: No template control (controlo sem modelo) (controlo negativo).



Deteção do controle interno (IC) no canal de fluorescência Cycling Orange com amplificação simultânea dos padrões de quantificação (HI Virus-1 RG QS 1–4). NTC: No template control (controlo sem modelo) (controlo negativo).

Para obter informações de licenciamento actualizadas e renúncia de responsabilidades específicas do produto, consultar o manual do utilizador ou o manual de instruções do kit QIAGEN respectivo. Os manuais do utilizador e do kit QIAGEN estão disponíveis em 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

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