

Fișa aplicației QIASymphony[®] RGQ

Aplicația QIASymphony RGQ *artus*[®] HI Virus-1 QS-RGQ Kit (tip de probă: plasmă)



Verificați disponibilitatea noilor revizuirii de etichetare electronică la www.qiagen.com/products/artushivirusrp-PCRkitce.aspx înainte de efectuarea testării. Stadiul revizuirii curente este indicat prin data eliberării (format: lună/an).

Informații generale

Kit	<i>artus</i> HI Virus-1 QS-RGQ Kit, Versiunea 1, REF 4513363, 4513366
Material de probă validat	Plasmă EDTA umană
Purificare inițială	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (nr. cat. 937055)
Volumul probei (inclusiv volum în exces)	1200 μ l
Set de parametri ai testului	<i>artus</i> _HIV plasma1000_V4
Set implicit de control al dozării	Cellfree1000_V6_DSP <i>artus</i> HIV
Volum de eluție	60 μ l
Versiune software necesară	Versiunea 4.0 sau mai recentă
Volum amestec master mix	30 μ l
Volumul șablon	20 μ l
Număr de reacții	6-24 sau 6-72*
Timp de testare pe modulul AS	Pentru 6 reacții: aproximativ 9 minute Pentru 72 de reacții: aproximativ 35 de minute

* În timpul executării mai multor testări, asigurați-vă că nu este depășită limita de 72 de reacții și 1 adaptor de stative pentru teste. Evitați prelungirea timpului de incubare (> 30 de minute) între finalizarea testării și transferul la Rotor-Gene[®] Q.

mai 2012



Sample & Assay Technologies

Materiale necesare, dar nefurnizate

Kit de purificare	■	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (nr. cat. 937055)
Adaptoare pentru QIASymphony SP	■	Elution Microtube Rack QS (Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym, nr. cat. 9020730)
	■	Tube Insert 3B al eprubetei (Element de inserție, 2,0 ml v2, samplecarr. (24), Qsym, nr. cat. 9242083)
Consumabile pentru QIASymphony SP	■	Sample Prep Cartridges, 8-well (nr. cat. 997002)
	■	8-Rod Covers (nr. cat. 997004)
	■	Filter-Tips, 1500 μ l (nr. cat. 997024)
	■	Filter-Tips, 200 μ l (nr. cat. 990332)
	■	Elution Microtubes CL (nr. cat. 19588)
	■	Tip disposal bags (nr. cat. 9013395)
	■	Micro tubes 2.0 ml Type H sau Micro tubes 2.0 ml Type I (Sarstedt, nr. cat. 72.693 și 72.694, www.sarstedt.com) pentru utilizare cu probe și substanțe de control interne
Adaptoare și suporturi de reactivi pentru QIASymphony AS	■	Reagent holder 1 QS (Cooling Adapter, Reagent Holder 1, Qsym, nr. cat. 9018090)
	■	Reagent holder 2 QS (Cooling Adapter, Reagent Holder 2, Qsym, nr. cat. 9018089)
	■	RG Strip Tubes 72 QS (Cooling Adapter, RG Strip Tubes 72, Qsym, nr. cat. 9018092)
Consumabile pentru QIASymphony AS	■	Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (nr. cat. 981103)
	■	Tubes, conical, 2 ml, Qsym AS (nr. cat. 997102) sau Micro tubes 2.0 ml Type I (Sarstedt, nr. cat. 72.694.005)
	■	Tube, conical, 5 ml, Qsym AS (nr. cat. 997104) sau Tubes with flat base from PP (Sarstedt, nr. cat. 60.558.001)
	■	Reagent Bottles, 30 ml, Qsym AS (nr. cat. 997108)
	■	Elution Microtubes CL (nr. cat. 19588)
	■	Filter-Tips, 1500 μ l (nr. cat. 997024)
	■	Filter-Tips, 200 μ l (nr. cat. 990332)
	■	Filter-Tips, 50 μ l (nr. cat. 997120)
	■	Tip disposal bags (nr. cat. 9013395)

* Vă rugăm să ne contactați pentru disponibilitate.

Manipularea și depozitarea probelor

Recoltarea probelor	Probă de sânge 5–10 ml sânge EDTA 8x amestec de suprafață – nu agitați! Nu trebuie utilizate probele umane heparinizate
Depozitarea probelor	Separare: Centrifugare 20 de minute, 800–1600 x g în termen de 24 de ore după recoltare Transferul plasmei izolate într-o eprubetă din polipropilenă sterilă ARN viral încapsulat, stabil la: 4 °C zile –20 °C săptămâni –70 °C luni
Transportul probelor	Transport rezistent la rupere Expediere în termen de 24 de ore Expediere prin poștă, conform instrucțiunilor legale privind transportul materialului patogen† Probele de sânge trebuie expediate în stare răcită (între 2 și 8 °C)
Substanțe de interferență	Heparina (≥ 10 UI/ml) afectează PCR. Probele colectate în eprubete care conțin heparină ca anticoagulant sau probele de la pacienții heparinizați nu trebuie utilizate. Nivelurile ridicate de albumină (≤ 6 g/dl), bilirubină (≤ 30 mg/dl), lipide (≤ 1 g/dl trigliceride), și probele hemolitice (≤ 2 g/dl hemoglobină) nu influențează sistemul.

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

† Asociația Internațională de Transport Aerian (International Air Transport Association, IATA). Regulamentele privind transportul mărfurilor periculoase.

Procedură

Prepararea ARN-ului de transport și adăugarea substanței de control interne în probe

Utilizarea QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit împreună cu *artus* HI Virus-1 QS-RGQ Kit necesită introducerea substanței de control interne (HI Virus-1 RG IC) în procedura de purificare pentru monitorizarea eficienței preparării probelor și a testului în aval.

Substanțele de control intern trebuie adăugate împreună cu amestecul de ARN de transport (CARRIER)–soluție tampon AVE (AVE), iar volumul total de amestec de substanță de control intern–ARN de transport (CARRIER)–soluție tampon AVE (AVE) trebuie să rămână de 120 μ l.

Tabelul reprezintă adăugarea substanței de control interne pentru izolare la un raport de 0,1 μ l la 1 μ l de eluție în volum. Se recomandă să preparați amestecuri proaspete pentru fiecare ciclu de funcționare, chiar înainte de utilizare.

Componentă	Volum (μ l) (eprubete Sarstedt®)*	Volum (μ l) (eprubete BD™)†
ARN de transport (CARRIER) standard	5	5
Substanță de control internă‡	9	9
Soluție tampon AVE	106	106
Volum final pe probă (fără volumul mort)	120	120
Volum total pentru n probe	(n x 120) + 360§	(n x 120) + 600¶

* Micro tubes 2.0 ml Type H și Micro tubes 2.0 ml Type I, Sarstedt nr. cat. 72.693 și 72.694.

† Tubes 14 ml, 17 x 100 mm polystyrene round-bottom (Becton Dickinson, nr. cat. 352051).

‡ Calculul cantității de substanță de control internă se bazează pe volumele de eluție inițiale (90 μ l). Volumul suplimentar al golurilor depinde de tipul eprubetei pentru probă utilizate.

§ Este necesar un amestec de substanță de control internă, corespunzător a 3 probe suplimentare (adică 360 μ l). Nu umpleți un volum total mai mare de 1,92 ml (corespunzând unui număr maxim de 13 probe). Aceste volume sunt specifice pentru Micro tubes 2.0 ml Type H și Micro tubes 2.0 ml Type I, Sarstedt nr. cat. 72.693 și 72.694).

¶ Este necesar un amestec de substanță de control internă, corespunzător a 5 probe suplimentare (adică 600 μ l). Nu umpleți un volum total mai mare de 13,92 ml (corespunzând unui număr maxim de 111 probe). Aceste volume sunt specifice produselor Tubes 14 ml, 17 x 100 mm polystyrene round-bottom, Becton Dickinson, nr. cat. 352051).

Configurarea QIASymphony SP

Sertarul „Waste” (Deșeuri)

Support al cutiilor individuale 1–4	Cutii individuale goale
Support al pungilor pentru deșeuri	Pungă pentru deșeuri
Support al flaconului de deșeuri lichide	Goliți și montați flaconul de deșeuri lichide

Sertarul „Eluate” (Eluat)

Stativ de eluție	Recomandăm utilizarea fantei 1, poziție de răcire
Volum de eluție*	Volum de eluție preselectat: 60 μ l Volum de eluție inițial: 90 μ l

* Volumul de eluție este preselectat pentru protocol. Acesta este volumul minim accesibil de eluat din eprubeta de eluție finală. Volumul inițial de soluție de eluție necesară pentru a se asigura că volumul de eluat propriu-zis este același cu volumul preselectat.

Sertarul „Reagents and Consumables” (Reactivi și consumabile)

RC poziția 1 și 2	Încărcați 1 cartuș cu reactivi (RC) pentru până la 48 de probe sau 2 cartușe cu reactivi noi (RC) pentru până la 96 de probe
Support al stativului pentru vârfuri poziția 1 – 4	Încărcați stative suficiente pentru vârfuri cu filtru de unică folosință, 200 μ l (consultați „Componente din plastic necesare pentru 1–4 loturi de probe”, pagina 6)
Support al stativului pentru vârfuri poziția 5 – 18	Încărcați stative suficiente pentru vârfuri cu filtru de unică folosință, 1500 μ l (consultați „Componente din plastic necesare pentru 1–4 loturi de probe”, pagina 6)
Support al cutiilor individuale poziția 1 – 3	Încărcați 3 cutii individuale care conțin cartușe pentru prepararea probelor
Support al cutiilor individuale poziția 4	Încărcați 1 cutie individuală care conține învelișuri pentru 8 tije

Sertarul „Sample” (Probă)

Tip probă	Plasmă
Volumul probei (inclusiv volum în exces)	1200 μ l
Eprubete pentru probe	Micro tubes 2.0 ml Type H sau Micro tubes 2.0 ml Type I (Sarstedt, nr. cat. 72.693 și 72.694)
Element de inserție	Tube Insert 3B (nr. cat. 9242083)

Componente din plastic necesare pentru 1–4 loturi de probe

	Un lot, 24 de probe [†]	Două loturi, 48 de probe [†]	Trei loturi, 72 de probe [†]	Patru loturi, 96 de probe [†]
Disposable filter-tips, 200 μl^{‡§}	28	52	76	100
Disposable filter-tips, 1500 μl^{‡§}	113	206	309	402
Cartușele pentru prepararea probei[¶]	21	42	54	72
8-Rod Covers^{**}	3	6	9	12

[†] Utilizarea mai multor eprubete cu substanță de control internă pe lot și efectuarea mai multor scanări ale inventarului necesită vârfuri cu filtru de unică folosință suplimentare.

[‡] Există 32 de vârfuri cu filtru/stativ pentru vârfuri.

[§] Numărul de vârfuri cu filtru necesare include vârfuri cu filtru pentru 1 scanare a inventarului pe cartuș cu reactivi.

[¶] Există 28 de cartușe de preparare a probei/cutie individuală.

^{**}Există douăsprezece învelișuri pentru 8 tije/cutie individuală.

Configurarea QIASymphony AS

Consumabile

În timpul configurării, pozițiile corespunzătoare pentru fiecare consumabil pe modulul QIASymphony AS sunt indicate pe ecranul tactil al instrumentului.

Consumabile	Nume pe ecranul tactil	Pentru utilizare cu adaptor/suport pentru reactivi
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 Reagent holder 2 QS
Tube, conical, 5 ml, Qsym AS (500)*†	QIA#997104 *T5.0 ScrewSkirt‡	Reagent holder 1 QS Reagent holder 2 QS
Reagent Bottles, 30ml, Qsym AS (50)*	QIA#997108 *Bottle 30ml‡	Reagent holder 2 QS
Elution Microtubes CL (24 x 96)	QIA#19588 * EMTR	Elution Microtube Rack QS

* Pentru componentele amestecului master mix, amestecul master mix preparat de sistem, soluțiile standard ale testelor și substanțele de control ale testelor.

† Alternativ, pot fi utilizate eprubetele Sarstedt descrise în „Materiale necesare, dar nefurnizate”, pagina 2.

‡ Sufixul „(m)” pe ecranul tactil indică faptul că toate calculele nivelului de lichid pentru eprubeta respectivă au fost optimizate pentru reactivi care formează un menisc concav.

Adoptoare și suporturi de reactivi

Stativ/suport de reactivi	Nume	Număr necesar [§]
Stativ pentru probe	Elution Microtube Rack QS	1
Suporturi de reactivi	Reagent holder 1 QS	1
Stative pentru teste	RG Strip Tubes 72 QS	1

[§] Calculat pentru o execuție a testului cu 72 de reacții.

Vârfuri cu filtru

Încărcați stativele pentru vârfuri cu fantele pentru vârfuri 1, 2 și 3 în sertarul „Eluate and Reagents” (Eluat și reactivi), apoi încărcați stativele pentru vârfuri în fantele pentru vârfuri 7, 8 și 9 în sertarul „Assays” (Teste).

Consumabil	Nume pe ecranul tactil	Număr minim pentru 24 de reacții	Număr minim pentru 72 de reacții
Filter-Tips, 1500 μ l (1024)	1500 μ l	5	6
Filter-Tips, 200 μ l (1024)	200 μ l	10	10
Filter-Tips, 50 μ l (1024)	50 μ l	25	73
Tip Disposal Bags	–	1	1

RT-PCR pe Rotor-Gene Q

Consultați fișa de protocol specifică software-ului „Setări pentru execuția *artus* QS-RGQ Kits” la www.qiagen.com/products/artushivirusrtpcrkitce.aspx.

Setări specifice pentru *artus* HI Virus-1 QS-RGQ Kit

Rotor-Gene AssayManager setează automat parametrii pentru *artus* HI Virus-1 QS-RGQ Kit.

Cu software-ul Rotor-Gene versiunea 2.1, setările specifice sunt prezentate mai jos.

Reaction Volume (Volum de reacție) (μl)	50
Hold (Reținere)	Hold Temperature: (Reținere temperatură:) 50 deg (50 de grade) Hold Time: (Timp de reținere:) 30 mins (30 de minute)
Hold 2 (Reținere 2)	Hold Temperature: (Reținere temperatură:) 95 deg (95 de grade) Hold Time: (Timp de reținere:) 15 mins (15 minute)
Cycling (Repetare ciclu)	50 time(s) (50 de ori) 95 deg for 30 secs (95 de grade timp de 30 de secunde) 50 deg for 60 secs (50 de grade timp de 60 de secunde) 72 deg for 30 secs (72 de grade timp de 30 de secunde)
Auto-Gain Optimisation Setup (Configurarea optimizării amplificării automate)	50 degrees (50 de grade) (Samples: (Probele:) Green (Verde); IC (substanță de control internă): Orange (Portocaliu))

Interpretarea rezultatelor

Această secțiune descrie interpretarea rezultatelor pe Rotor-Gene Q. Revedeți și informațiile privind starea probelor din fișierele cu rezultate QIASymphony SP/AS, pentru analiza fluxului de lucru complet, de la probă la rezultat. Trebuie utilizate doar probele cu o stare validă

Rotor-Gene AssayManager interpretează automat rezultatele PCR și oferă concluzia și rezultatul cantitativ.

Secțiunile următoare descriu interpretarea rezultatelor utilizând software-ul RotorGene versiunea 2.1 sau mai recentă.

Detectarea semnalului și concluzii

Semnal pe canalul Cycling Green	Semnal pe canalul Cycling Orange	Rezultat cantitativ (UI/ml)	Interpretare
Da	Da	< 76,4	Rezultat valid: ARN HIV-1 detectat, < 100 UI/ml Cuantificare imposibilă, deoarece rezultatul cantitativ este sub limita de detecție. Reproductibilitatea rezultatului pozitiv nu este asigurată.
Da	Da	≥ 76,4 și < 100	Rezultat valid: ARN HIV-1 detectat, < 100 UI/ml Cuantificare imposibilă, deoarece rezultatul cantitativ este sub intervalul liniar al testului.
Da	Da	≥100 și ≤1,00 x 10 ⁸	Rezultat valid: ARN HIV-1 detectat la concentrația calculată Rezultatul cantitativ se încadrează în intervalul liniar al testului.
Da	Da	> 1,00 x 10 ⁸	Rezultat valid: ARN HIV-1 detectat, >1,00 x 10 ⁸ Cuantificare imposibilă, deoarece rezultatul cantitativ depășește intervalul liniar al testului.*
Nu	Da	–	Rezultat valid: Niciun ARN HIV-1 nu este detectabil.†
Nu	Nu	–	Rezultat nevalid: Nu se poate obține o concluzie cu privire la rezultate.‡

* Dacă se dorește cuantificarea, diluați proba cu plasmă fără HIV și reprocessați-o. Înmulțiți rezultatul cantitativ din proba reprocessată cu factorul de diluție.

† Dacă valoarea C_T pentru substanța de control internă a unei probe negative este cu mai mult de 3 cicluri mai mare decât valoarea C_T pentru substanța de control internă a substanței de control fără șablon (no template control) din testare (C_T IC probă – C_T IC NTC >3), atunci proba trebuie tratată ca nevalidă. Nu se poate obține o concluzie cu privire la rezultate.

‡ Informațiile privitoare la sursele de eroare și soluția acestora pot fi găsite în „Ghidul de remediere” al Ghidului artus *HI Virus-1 QS-RGQ Kit*.

Configurarea pragului pentru analiza PCR

Setările pragului optim pentru o anumită combinație între instrumentul Rotor-Gene Q și *artus* QS-RGQ Kit trebuie făcute empiric, prin testarea fiecărei combinații în parte, deoarece pragul reprezintă o valoare relativă, care depinde de fluxul de lucru general pentru diagnosticare. Pragul poate fi setat la o valoare preliminară egală cu 0,04 pentru analiza primei testări PCR, dar această valoare trebuie reglată fin, în cadrul unei analize comparative a testărilor ulterioare ale fluxului de lucru. Pragul trebuie setat manual, chiar deasupra semnalului de fond al substanțelor de control negative și al probelor negative. Valoarea medie a pragului calculată din aceste experimente va funcționa, cel mai probabil, pentru cele mai multe testări ulterioare, dar utilizatorul trebuie să revizuiască valoarea de prag generată la intervale regulate. Valoarea de prag va fi, de obicei, cuprinsă în intervalul 0,03–0,05, și trebuie rotunjită la maximum trei zecimale.

Cuantificarea

Substanțele standard de cuantificare (HI Virus-1 RG QS 1–4) din *artus* HI Virus-1 QS-RGQ Kit sunt tratate ca probe purificate anterior și se utilizează același volum (20 μ l). Pentru a genera o curbă standard pe instrumentele Rotor-Gene Q, toate cele 4 standarde de cuantificare trebuie utilizate și definite în caseta de dialog „Edit Samples” („Editare probe”) pe instrumentul Rotor-Gene Q ca standarde cu concentrațiile specificate (consultați manualul de utilizare al instrumentului).

Notă: Substanțele standard de cuantificare sunt definite ca UI/ μ l.* Ecuația următoare trebuie aplicată pentru transformarea valorilor determinate, utilizând curba standard, în UI/ml de material de probă

$$\text{Rezultat (UI/ml)} = \frac{\text{Rezultat (UI/\mu l)} \times \text{Volum de eluție inițial (90 \mu l)}^\dagger}{\text{Volumul probei (ml)}}$$

În principiu, volumul inițial al probei trebuie introdus în ecuația de mai sus. Acesta trebuie luat în considerare atunci când volumul probei a fost modificat înainte de extracția acizilor nucleici (de exemplu, reducerea volumului prin centrifugare sau creșterea volumului prin adăugare la volumul necesar pentru izolare).

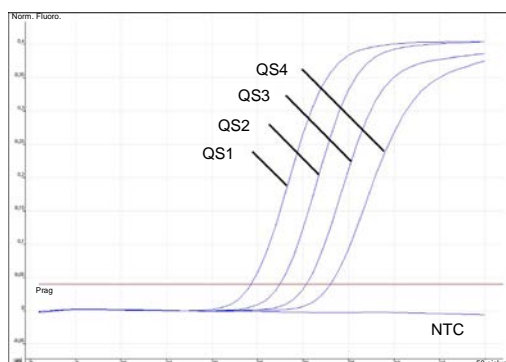
Factorul de conversie

1 UI/ml corespunde unei valori de 0,45 copii/ml pentru detecția ARN-ului HIV-1 pe Rotor-Gene Q. Factorul de conversie a fost stabilit printr-o analiză de regresie a mai multor serii de diluții, comparată cu o metodă de referință, exprimată în copii/ml.

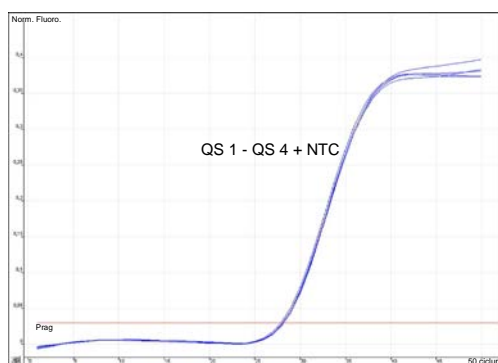
* Substanța standard a fost calibrată utilizând Standardul internațional pentru HIV (International HIV Standard) (OMS).

† Calculul se bazează pe volumele de eluție inițiale (90 μ l).

Exemple de reacții PCR pozitive și negative



Detectarea substanțelor standard de cuantificare (HI Virus-1 RG QS 1–4) pe canalul de fluorescență Cycling Green. NTC: No template control (substanță de control fără șablon) (substanță de control negativă).



Detectarea substanței de control interne (internal control, IC) pe canalul de fluorescență Cycling Orange cu amplificarea simultană a substanțelor standard de cuantificare (HI Virus-1 RG QS 1–4). NTC: No template control (substanță de control fără șablon) (substanță de control negativă).

Pentru informații actualizate privind licențele și clauzele de declinare a răspunderii specifice produselor, consultați ghidul sau manualul de utilizare al kit-ului QIAGEN respectiv. Ghidurile și manualele de utilizare pentru kit-urile QIAGEN sunt disponibile pe www.qiagen.com sau pot fi solicitate de la Serviciul tehnic QIAGEN sau distribuitorul dumneavoastră local.

Mărci comerciale: QIAGEN®, QIASymphony®, artus®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); BD™ (Becton, Dickinson and Company); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.).

© 2012 QIAGEN, toate drepturile rezervate.

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