

Folha de aplicação QIAAsymphony® RGQ

Folha de aplicação do kit *artus*® HBV QS-RGQ para tipo de amostra de plasma

IVD



Verificar se há novas revisões de rotulagem eletrônica disponíveis em www.qiagen.com/artus-HBV-QS-RGQ-eL antes de realizar o teste. O estado de revisão atual é indicado pela data de lançamento (formato: mês/ano).

Setembro de 2015



Sample & Assay Technologies

Informações gerais

Kit	Kit <i>artus</i> HBV QS-RGQ, versão 1, n° cat. 4506356
Material de amostras validado	Plasma humano tratado com EDTA
Kit de Purificação	Kit QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi (n° cat. 937055)
Volume da amostra	1200 μ l
Conjunto de parâmetros de ensaio	artus_HBV_plasma1000_V4 ou superior
Conjunto de controle do ensaio predefinido	Cellfree1000_V6_DSP_artus_HBV ou superior
Volume de eluição	60 μ l
Versão de software necessária	Versão 4.0 ou superior
Volume de master mix	30 μ l
Volume de eluído	20 μ l
Número de reações	7-72
Tempo de corrida no módulo AS	Aproximadamente 7 minutos para 7 reações Aproximadamente 35 minutos para 72 reações

Materiais necessários, mas não fornecidos

Kit de purificação	■ Kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi(nº cat. 937055)
Adaptadores para QIASymphony SP	■ Elution Microtube Rack QS [rack de microtubos de eluição QS] (Cooling Adapter [adaptador de refrigeração], EMT, v2, Qsym, nº cat. 9020730) ■ Tube Insert 3B [inserto de tubos 3B] (Insert [inserto], 2,0ml v2, samplecarr. [transportador de amostra] (24), Qsym, nº cat. 9242083)
Consumíveis para QIASymphony SP	■ Sample Prep Cartridges, 8-well [cartuchos de prep. da amostra, 8 poços] (nº cat. 997002) ■ 8-Rod Covers [capas de 8 barras] (nº cat. 997004) ■ Filter-Tips [ponteiras com filtro], 1500 µl (nº cat. 997024) ■ Filter-Tips [ponteiras com filtro], 200 µl (nº cat. 990332) ■ Elution Microtubes CL [microtubos de eluição CL] (nº cat. 19588) ■ Tip disposal bags [saco de descarte de ponteiras] (nº 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, nº cat. 72.693 e 72.694, www.sarstedt.com)
Adaptadores e suportes de reagentes para o QIASymphony AS	■ Reagent holder 1 QS [suporte de reagente 1 QS] (Cooling Adapter [adaptador de refrigeração], Reagent Holder 1 [suporte de reagente 1], Qsym, nº cat. 9018090) ■ Reagent holder 2 QS [suporte de reagente 2 QS] (Cooling Adapter [adaptador de refrigeração], Reagent Holder 2 [suporte de reagente 2], Qsym, nº cat. 9018089) ■ RG Strip Tubes 72 QS [strips de tubos RG 72 QS] (Cooling Adapter [adaptador de refrigeração], RG Strip Tubes 72 [strips de tubos RG 72], Qsym, nº cat. 9018092)
Consumíveis para o	■ Strip Tubes and Caps [strips de tubos e tampas], 0,1 ml (nº

QIAasymphony AS

cat. 981103)

- Tubes, conical [tubos, cônicos], 2 ml, Qsym AS (n° cat. 997102)* ou Micro tubes 2.0 ml Type I [microtubos 2,0 ml tipo I] (Sarstedt, n° cat. 72.694.005)
- Tube, conical [tubo, cônico], 5 ml Qsym AS (n° cat. 997104)* ou Tubes with flat base from PP [tubos com base plana de PP] (Sarstedt, n° cat. 60.558.001)
- Elution Microtubes CL [microtubos de eluição CL] (n° cat. 19588)
- Filter-Tips [ponteiras com filtro], 1500 μ l (n° cat. 997024)
- Filter-Tips [ponteiras com filtro], 200 μ l (n° cat. 990332)
- Filter-Tips [ponteiras com filtro], 50 μ l (n° cat. 997120)
- Tip disposal bags [saco de descarte de ponteiras] (n° cat. 9013395)

* Verificar a disponibilidade em estoque.

Manuseio e armazenamento de amostras

Coleta da amostra	Amostra de sangue 5–10 ml de sangue tratado com EDTA Inverter 8x — não agitar! Não devem ser usadas amostras humanas tratadas com heparina
Armazenamento de amostras	Separação: 20 minutos de centrifugação, 800–1600 x g dentro de 24 horas após a coleta Transferir o plasma isolado para um tubo de polipropileno estéril A sensibilidade do ensaio pode ser reduzida se as amostras forem congeladas de forma rotineira ou armazenadas por um período mais longo. DNA de vírus encapsulados estável 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 patogênico† As amostras de sangue devem ser enviadas refrigeradas (2-8 °C)
Substâncias interferentes	A heparina (≥ 10 IU/ml) afeta a PCR. Não devem ser usadas amostras coletadas em tubos contendo heparina como anticoagulante, nem amostras de pacientes tratados com heparina.
Preparação da amostra	Evitar a formação de espuma nas amostras. As amostras devem ser estabilizadas à temperatura ambiente (15–25 °C) antes de dar início ao ensaio.

* Arbeitskreis Blut, V17 (09/1997), Bundesgesundheitsblatt 11/1997, p. 452–456.

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

Procedimento

Preparação do Carreador de RNA (CARRIER) e acréscimo do controle interno às amostras

O uso do kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi em conjunto com o kit *artus* HBV QS-RGQ requer a introdução do controle interno (HBV RG/TM IC) no procedimento de purificação para monitorar a eficiência da preparação da amostra e do processo "downstream".

Os controles internos devem ser adicionados à mistura Carreador de RNA (CARRIER)-tampão AVE (AVE), e o volume total da mistura de controle interno-Carreador de RNA (CARRIER)-tampão AVE (AVE) deve continuar igual a 120 μ l.

A tabela representa o acréscimo do controle interno à purificação numa proporção de 0,1 μ l por 1 μ l de volume de eluição. Recomenda-se utilizar a mistura imediatamente após o preparo da mesma (não armazenar para uso posterior).

Componente	Volume (μ l) (tubos Sarstedt®)*	Volume (μ l) (tubos Corning®)†
Carreador de RNA: solução estoque (CARRIER)	5	5
Controle 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° 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 de poliestireno] (Corning, n° cat. 352051).

‡ O cálculo da quantidade de controle 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 controle interno correspondente a 3 amostras adicionais (ou seja, 360 μ l). Não preencher o tubo com volume superior a 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° cat. 72.693 e 72.694).

[¶] É necessária uma mistura de controle interno correspondente a 5 amostras adicionais (ou seja, 600 µl). Não preencher o tubo com volume superior a 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 de poliestireno] (Corning, n° cat. 352051)

Configuração do QIA Symphony SP

Gaveta "Waste" (Resíduos)

Suporte de caixa de unidades 1-4	Caixas de unidades vazias
Suporte de saco de descarte	Saco de descarte
Suporte do frasco de resíduos líquidos	Esvaziar e instalar o frasco de resíduos líquidos

Gaveta "Eluate" (Eluído)

Rack de eluição	Usar posição 1, posição de refrigerada
Volume de eluição*	Volume de eluição pré-selecionado: 60 μ l Volume de eluição inicial: 90 μ l

* O volume de eluição é pré-selecionado para o protocolo. Este é o volume acessível mínimo de eluído no tubo de eluição final. O volume inicial da solução de eluição é necessário para garantir que o volume real de eluído seja igual ao volume pré-selecionado.

Gaveta "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 reagente (RC) novos para um máximo de 96 amostras
Posições do suporte de racks de ponteiras 1-18	Carregar quantidade suficiente de racks de ponteiras com filtro descartáveis suficientes, 200 μ l e 1500 μ l (ver " Material plástico necessário para 1-4 lotes de amostras", página 10)
Suporte de caixa de unidades posição 1-4	Carregar caixas de unidades contendo cartuchos de preparação de amostras (sample preps) e capas de 8 barras (8-rod covers) (ver " Material plástico necessário para 1-4 lotes de amostras", página 10)

Gaveta "Sample" (Amostra)

Tipo de amostra	Plasma
Volume da amostra (incluindo volume excedente)	1200 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° cat. 72,693 e 72,694)
Inserto	Tube Insert 3B [inserto de tubo 3B] (n° cat. 9242083)

Material plástico necessário para 1-4 lotes de amostras

	1 lote, 24 amostras*	2 lotes, 48 amostras*	3 lotes, 72 amostras*	4 lotes, 96 amostras*
Ponteiras com filtro descartáveis, 200 μ l ^{†‡}	28	52	80	104
Ponteiras com filtro descartáveis, 1500 μ l ^{†‡}	85	162	247	324
Cartuchos de preparação de amostras (sample preps) [§]	21	42	63	84
Capas de 8 barras (8-rod covers) [¶]	3	6	9	12

* Utilizar mais de um tubo de controle interno por lote e efetuar mais de uma inventariação requer ponteiras com filtro descartáveis adicionais.

† Há 32 ponteiras com filtro por rack de ponteiras.

‡ O número de ponteiras com filtro necessárias inclui ponteiras com filtro para uma inventariação por cartucho de reagente (RC).

§ Há 28 cartuchos de preparação de amostras (sample preps) por caixa de unidades.

¶ Há doze capas de 8 barras (8-rod covers) por caixa de unidades.

Configuração do QIA Symphony AS

Consumíveis

Durante a configuração, as posições corretas para cada consumível no QIA Symphony AS são indicadas na tela *touchscreen* do instrumento.

Consumíveis	Nome na tela <i>touchscreen</i>	Para uso com adaptador/suporte de reagente
Strips de tubos e tampas, 0,1 ml (250)	QIA#981103 * *StripTubes 0.1	Strips de tubos RG 72 QS
Tubos, cônicos, 2 ml, Qsym AS (500)*†	QIA#997102 *T2.0 ScrewSkirt‡	Suporte de reagente 1 QS Suporte de reagente 2 QS
Tubo, cônico, 5 ml, Qsym AS (500)*†	QIA#997104 *T5.0 ScrewSkirt‡	Suporte de reagente 1 QS Suporte de reagente 2 QS
Microtubos de eluição CL (24 x 96)	QIA#19588 * EMTR	Rack de microtubos de eluição QS

* Para componentes do master mix, master mix preparado pelo sistema, padrões de ensaio e controles de ensaio.

† Como alternativa, podem ser usados os tubos Sarstedt descritos em " Materiais necessários, mas não fornecidos", página 3.

‡ O sufixo "(m)" na tela *touchscreen* indica que os cálculos de nível do líquido para o respectivo tubo foram otimizados para os reagentes formando um menisco côncavo.

Adaptadores e suportes de reagentes

Rack/suporte de reagentes	de Nome	Número necessário [§]
Sample rack (Rack de amostras)	Elution Microtube Rack (Rack de microtubos de eluição QS)	1 QS
Reagent holders (Suportes de reagentes)	Reagent holder QS	1 QS (Suporte de reagente 1 QS)

Assay racks (Racks de RG Strip Tubes 72 QS (Tiras de tubos RG 72 1
ensaio) QS)

§ Calculado para uma corrida de ensaio com 72 reações.

Ponteiras com filtro

Carregar a gaveta "Eluate and Reagents" (Eluído e reagentes) com racks de ponteiras, começando pelas posições de ponteiras 1, 2 e 3, e carregar depois a gaveta "Assays" (Ensaio) com racks de ponteiras, nas posições de ponteiras 7, 8 e 9.

Consumível	Nome na tela touchscreen	Número mínimo para 24 reações	Número mínimo para 72 reações
Ponteiras com filtro, 1500 µl (1024)	1500 µl	4	5
Ponteiras com filtro, 200 µl (1024)	200 µl	9	8
Ponteiras com filtro, 50 µl (1024)	50 µl	25	73
Saco de descarte de ponteiras	–	1	1

PCR no Rotor-Gene® Q

A reação do kit *artus* HBV QS-RGQ deve ser realizada no Rotor-Gene Q usando análise manual com o software Rotor-Gene Q 2.3 ou superior. Definir os seguintes parâmetros para a corrida.

Definição	Parâmetro
Volume de reação (µL)	50
"Hold"	Temperatura: 95 graus Tempo: 10 minutos
"Cycling"	45 vezes 95 graus durante 15 segundos 55 graus durante 30 segundos 72 graus durante 15 segundos
Configuração da otimização de ganho automático ("Gain optimization")	55 graus (Amostras: Verde; IC: Amarelo)

Para instruções mais detalhadas, consultar "Definições de corrida dos kits *artus* QS-RGQ (software Rotor-Gene Q 2.3 ou superior)" em www.qiagen.com/artus-HBV-QS-RGQ-eL.

Interpretação dos resultados

Esta seção descreve a interpretação dos resultados no Rotor-Gene Q usando o software Rotor-Gene Q 2.3 ou superior. Conferir os arquivos de resultados do QIASymphony SP/AS para verificar o status da amostra. Devem ser utilizadas somente amostras definidas como válidas. Informações sobre causas de erro e respectivas soluções podem ser encontradas no "Guia de resolução de problemas" do *manual do kit artus HBV QS-RGQ*.

Configuração do limiar (threshold) para a análise PCR

Para garantir que os dados gerados serão análogos às características de desempenho do kit *artus* HBV QS-RGQ, usar os seguintes parâmetros para analisar todos os dados gerados com o kit *artus* HBV QS-RGQ.

Definições para a análise PCR

Canal	Alvo	Tubo dinâmico (Dynamic tube)	Limiar (Threshold)	Correção de declive (slope correct)	Ignorar os primeiros (Ignore first)
Verde	HBV	Ligado	0,03	Desligada	10 ciclos
Amarelo	IC	Ligado	0,03	Desligada	10 ciclos

1. **Depois de concluída a corrida, analisar os dados com o software Rotor-Gene Q versão 2.3 ou superior.**
2. **Abrir o arquivo de execução (se estiver fechado) e selecionar "Analysis" (Análise) e "Cycling A.Green" (Ciclo A.Verde) para a análise da carga viral de HBV.**
3. **Selecionar "Dynamic tube" (Tubo dinâmico).**
4. **Certificar-se de que "Slope correct" (correção de declive) não está selecionado.**
5. **Selecionar "Ignore first" (Ignorar os primeiros) e definir para "10".**
Isto irá ignorar os dados dos 10 primeiros ciclos desta corrida.
6. **Definir o gráfico para a escala linear e o limiar (threshold) para "0,03".**
Os dados podem ser exportados clicando com o botão direito do mouse na janela "Results" (Resultados) e usando a função "Export to Excel" (Exportar para Excel).
7. **Para a análise dos valores IC, selecionar "Analysis" (Análise) e "Cycling A. Yellow" (Ciclo A. Amarelo)**
8. **Selecionar "Dynamic tube" (Tubo dinâmico).**
9. **Certificar-se de que "Slope correct" (correção de declive) não está selecionado.**
10. **Selecionar "Ignore first" (Ignorar os primeiros) e definir para "10".**
Isto irá ignorar os dados dos 10 primeiros ciclos desta corrida.
11. **Definir o gráfico para a escala linear e o limiar (threshold) para "0,03".**
Os dados podem ser exportados clicando com o botão direito do mouse na janela "Results" (Resultados) e usando a função "Export to Excel" (Exportar para Excel).
12. **Converter os valores de titulação de IU/ μ l para IU/ml através da equação indicada em "Quantitation" (Quantificação), página 16.**

Quantificação

Os padrões de quantificação (HBV RG/TM QS 1–5) do kit *artus* HBV QS-RGQ são tratados como amostras previamente purificadas, sendo utilizado o mesmo volume (20 µl) para a reação. Para gerar uma curva-padrão no Rotor-Gene Q, todos os 5 padrões de quantificação devem ser usados e definidos na caixa de diálogo "Edit Samples" (Editar amostras) no Rotor-Gene Q como padrões com as concentrações especificadas. Consultar o respectivo manual do usuário para obter mais instruções.

Nota: Os padrões de quantificação são definidos como IU/µl e foram calibrados utilizando o Padrão Internacional do HBV (OMS). A seguinte equação tem de ser aplicada para converter os valores determinados usando a curva-padrão para IU/ml de material de amostra. O cálculo é baseado nos volumes de eluição iniciais (90 µl).

$$\text{Resultado (IU/ml)} = \frac{\text{Resultado (IU/}\mu\text{l)} \times 90 \mu\text{l (volume de eluição inicial)}}{\text{Volume de amostra (ml)}}$$

Como regra geral, o volume de amostra inicial deve ser inserido na equação acima representada. Isto deve ser considerado quando o volume da amostra tiver sido alterado antes da extração do ácido nucleico (por ex.: reduzir o volume por centrifugação ou aumentar o volume por acréscimo ao volume necessário para a purificação).

Fator de conversão

Um IU/ml corresponde a 8,21 cópias/ml para a detecção de DNA de HBV no Rotor-Gene Q. O fator de conversão foi estabelecido por uma análise de regressão de diluições seriadas múltiplas em comparação com um relatório de método de referência em cópias/ml.

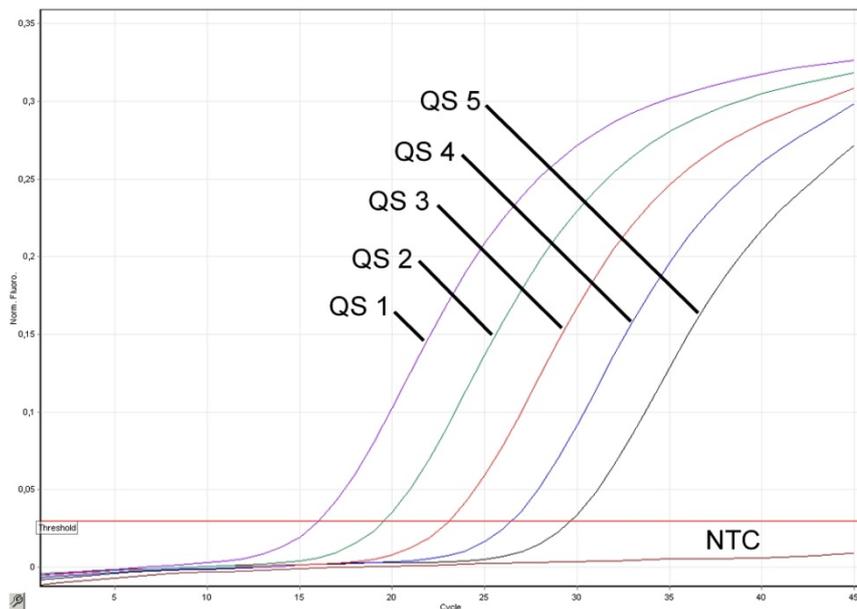
Detecção de sinal e conclusões

Sinal no canal Cycling Green	Sinal no canal Cycling Yellow	Resultado quantitativo (IU/ml)	Interpretação
Sim	Sim	<10,22	Resultado válido: DNA de HBV detectado, <31,6 IU/ml* A quantificação não é possível, já que o resultado quantitativo está abaixo do limite de detecção. A reprodutibilidade do resultado positivo não é garantida.
Sim	Sim	$\geq 10,22$ e <31,6	Resultado válido: DNA de HBV detectado, <31,6 IU/ml* A quantificação não é possível, já que o resultado quantitativo está abaixo do intervalo linear do ensaio.
Sim	Sim/Não [†]	$\geq 31,6$ e $\leq 2 \times 10^7$	Resultado válido: DNA de HBV detectado na concentração calculada O resultado quantitativo está dentro do intervalo linear do ensaio.
Sim	Sim/Não [†]	$> 2 \times 10^7$	Resultado válido: DNA de HBV detectado, $> 2 \times 10^7$ IU/ml A quantificação não é possível, já que o resultado quantitativo está acima do intervalo linear do ensaio.
Não	Sim	–	Resultado válido: Não é detectável DNA de HBV.
Sim	Não	<31,6	Resultado inválido: Não é possível inferir nenhum resultado.
Não	Não	–	Resultado inválido: Não é possível inferir nenhum resultado.

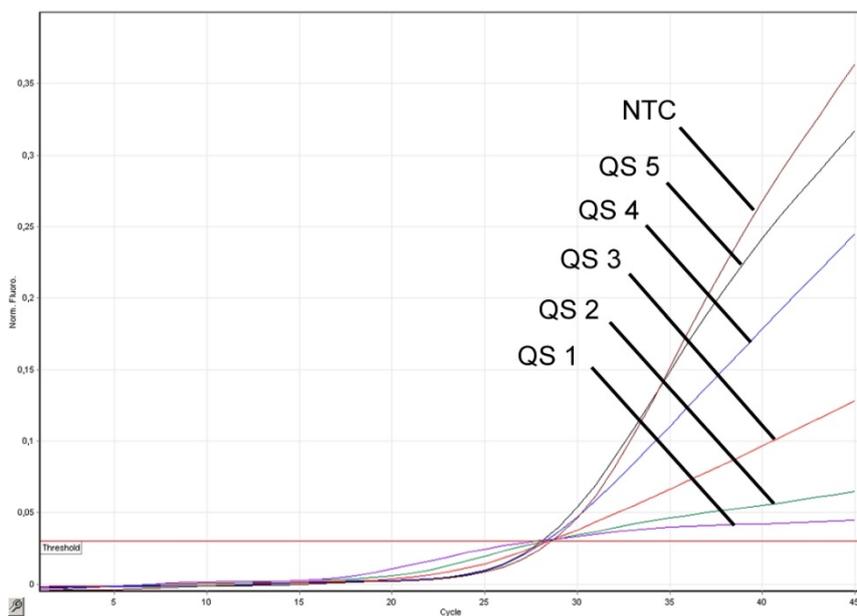
* Se o valor C_T para o controle interno de uma amostra abaixo do intervalo linear ou de uma amostra negativa for superior em mais de 3 ciclos ao valor C_T para o controle interno do controle sem modelo do ensaio ($C_{TIC\ Amostra} - C_{TIC\ NTC} > 3$), então a amostra deve ser tratada como inválida. Não é possível inferir nenhum resultado.

[†] Neste caso, é dispensável a detecção de um sinal no canal Cycling Yellow, já que altas concentrações iniciais de DNA de HBV (sinal positivo no canal Cycling Green) podem levar a um sinal de fluorescência reduzido ou ausente do controle interno no canal Cycling Yellow (concorrência).

Exemplos de reações PCR positivas e negativas



Deteção dos padrões de quantificação (HBV RG/TM QS 1-5) no canal de fluorescência Cycling Green. NTC: controle sem alvo (controle negativo).



Deteção do controle interno (IC) no canal de fluorescência Cycling Yellow com amplificação simultânea dos padrões de quantificação (HBV RG/TM QS 1-5). NTC: controle sem alvo (controle negativo).

Para obter informações de licenciamento atualizadas e termos de isenção de responsabilidade específicos do produto, consultar o manual do usuário ou o manual de instruções do respectivo kit QIAGEN. Os manuais dos kits QIAGEN e manuais do usuário estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados à assistência técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Marcas registradas: QIAGEN®, QIASymphony®, artus®, Rotor-Gene® (Grupo QIAGEN); Corning® (Corning Incorporated); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.).

Setembro de 2015 HB-2001-S01-001 © 2015 QIAGEN, todos os direitos reservados.

www.qiagen.com

Brasil = 0800-557779



Sample & Assay Technologies