

Karta zastosowania QIASymphony® RGQ

Zastosowanie QIASymphony RGQ

artus® HBV QS-RGQ Kit (typ próbki: osocze)



Przed wykonaniem testu należy sprawdzić dostępność nowych elektronicznych wersji oznakowania pod adresem www.qiagen.com/products/artushbvprkitce.aspx. Status aktualnej wersji jest wskazywany przez datę wydania (format: miesiąc/rok).

Informacje ogólne

Zestaw	artus HBV QS-RGQ Kit, wersja 1, REF 4506363, 4506366
Zatwierdzony materiał próbki	Ludzkie osocze z EDTA
Oczyszczanie początkowe	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (nr kat. 937055)
Objętość próbki (wliczając w to nadwyżkę)	1200 µl
Zestaw parametrów badania	artus_HBV_plasma1000_V4
Domyślny zestaw ustawień kontrolnych	Cellfree1000_V6_DSP_artus_HBV
Objętość elucji	60 µl
Wymagana wersja oprogramowania	Wersja 4.0 lub wyższa
Objętość mieszaniny Master mix	30 µl
Objętość matrycy	20 µl
Liczba reakcji	7–24 lub 7–72*
Czas trwania programu w module AS	W przypadku 7 reakcji: około 7 minut W przypadku 72 reakcji: około 35 minut

* W przypadku konfiguracji oznaczenia pod kątem wirusa HBV w aparacie QIASymphony AS można ustawić maksymalnie 216 (3 x 72) oznaczeń podczas jednego programu



Maj 2012

Sample & Assay Technologies

Materiały wymagane, ale niedostarczone

Zestaw do oczyszczania	■	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (nr kat. 937055)
Adaptory do aparatu QIASymphony SP	■	Statyw do mikropróbówek do elucji QS (Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym, nr kat. 9020730)
	■	Wkład próbkowy 3B (Insert, 2.0ml v2, samplecarr. (24), Qsym, nr kat. 9242083)
Materiały eksploatacyjne dla aparatu QIASymphony SP	■	Sample Prep Cartridges, 8-well (nr kat. 997002)
	■	8-Rod Covers (nr kat. 997004)
	■	Filter-Tips, 1500 µl (nr kat. 997024)
	■	Filter-Tips, 200 µl (nr kat. 990332)
	■	Elution Microtubes CL (nr kat. 19588)
	■	Tip disposal bags (nr kat. 9013395)
	■	Micro tubes 2.0 ml Type H lub Micro tubes 2.0 ml Type I (Sarstedt, nr kat. 72.693 i 72.694, www.sarstedt.com) do użytku z próbkami i kontrolami wewnętrznymi
Adaptory i uchwyty na odczynniki dla QIASymphony AS	■	Uchwyt na odczynniki 1 QS (Cooling Adapter, Reagent Holder 1, Qsym, nr kat. 9018090)
	■	Uchwyt na odczynniki 2 QS (Cooling Adapter, Reagent Holder 2, Qsym, nr kat. 9018089)
	■	Probówki w paskach RG 72 QS (Cooling Adapter, RG Strip Tubes 72, Qsym, nr kat. 9018092)
Materiały eksploatacyjne dla aparatu QIASymphony AS	■	Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (nr kat. 981103)
	■	Tubes, conical, 2 ml, Qsym AS (nr kat. 997102)* lub Micro tubes 2.0 ml Type I (Sarstedt, nr kat. 72.694.005)
	■	Tube, conical, 5 ml, Qsym AS (nr kat. 997104)* lub Tubes with flat base from PP (Sarstedt, nr kat. 60.558.001)
	■	Reagent Bottles, 30 ml, Qsym AS (nr kat. 997108)
	■	Elution Microtubes CL (nr kat. 19588)
	■	Filter-Tips, 1500 µl (nr kat. 997024)
	■	Filter-Tips, 200 µl (nr kat. 990332)
	■	Filter-Tips, 50 µl (nr kat. 997120)
	■	Tip disposal bags (nr kat. 9013395)

* Proszę sprawdzić dostępność.

Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami

Pobieranie próbek	Próbka krwi 5–10 ml krwi z EDTA Wymieszać, odwracając 8x — nie wstrząsać! Nie należy używać ludzkich próbek heparynizowanych.
Przechowywanie próbek	Rozdzielenie: wirowanie przez 20 minut, 800–1600 x <i>g</i> w ciągu 24 godzin od pobrania Przenieść oddzielone osocze do jałowej próbki z polipropylenu Rutynowe mrożenie próbek lub przechowywanie ich przez dłuższy czas może zmniejszyć czułość oznaczenia. Stabilność wirusowego DNA w otoczce w temperaturze*: 4°C dni –20°C tygodnie –70°C miesiące
Transport próbek	Transport w pojemniku odpornym na rozbicie Dostawa w ciągu 24 godzin Wysyłka pocztą zgodnie z przepisami prawa dotyczącymi transportu materiału zakaźnego† Próbki krwi należy transportować w warunkach chłodniczych (od 2 do 8°C)
Substancje zakłócające	Heparyna (≥ 10 IU/ml) ma wpływ na reakcję PCR. Nie należy używać próbek pobranych do probówek zawierających heparynę jako antykoagulant oraz próbek pobranych od pacjentów leczonych heparyną.
Przygotowanie próbki	Nie dopuszczać do wytworzenia piany w próbkach lub na ich powierzchni. Przed rozpoczęciem programu należy doprowadzić próbki do temperatury pokojowej (15–25°C).

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

† Międzynarodowe Zrzeszenie Przewoźników Powietrznych (International Air Transport Association, IATA). Przepisy dotyczące transportu materiałów niebezpiecznych w międzynarodowym transporcie lotniczym (Dangerous Goods Regulations).

Procedura

Przygotowanie nośnika RNA i dodanie kontroli wewnętrznej do próbek

Stosowanie zestawu QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit w połączeniu z zestawem *artus* HBV QS-RGQ Kit wymaga wprowadzenia kontroli wewnętrznej (HBV RG/TM IC) do procedury oczyszczania w celu monitorowania wydajności przygotowywania próbek i dalszych oznaczeń.

Kontrole wewnętrzne należy dodać wraz z mieszaniną nośnik RNA (CARRIER)–bufor Buffer AVE (AVE). Całkowita objętość mieszaniny kontrola wewnętrzna–nośnik RNA (CARRIER)–bufor Buffer AVE (AVE) nadal wynosi 120 µl.

Tabela przedstawia dodawanie kontroli wewnętrznej do procedury izolacji w stosunku 0,1 µl na 1 µl objętości elucji. Zaleca się przygotowanie świeżych mieszanin dla każdego cyklu bezpośrednio przed użyciem.

Składnik	Objętość (µl) (próbówki Sarstedt®)*	Objętość (µl) (próbówki BD™)†
Roztwór podstawowy nośnika RNA (CARRIER)	5	5
Kontrola wewnętrzna‡	9	9
Bufor Buffer AVE	106	106
Objętość końcowa na próbkę (wyłączając objętość martwą)	120	120
Całkowita objętość dla n próbek	(n x 120) + 360§	(n x 120) + 600¶

* Micro tubes 2.0 ml Type H i Micro tubes 2.0 ml Type I, Sarstedt, nr kat. 72.693 i 72.694.

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

‡ Obliczenie ilości kontroli wewnętrznej opiera się na początkowych objętościach elucji (90 µl). Dodatkowa objętość nieużyteczna zależy od typu użytej próbki.

§ Wymagana jest objętość mieszaniny kontroli wewnętrznej odpowiadająca 3 dodatkowym próbkom (tj. 360 µl). Nie napełniać do więcej niż 1,92 ml całkowitej objętości (co odpowiada maksymalnej liczbie 13 próbek. Objętości te są charakterystyczne dla mikropróbówek Micro tube 2.0 ml Type H i Micro tube 2.0 ml Type I, Sarstedt, nr kat. 72.693 i 72.694).

¶ Wymagana jest objętość mieszaniny kontroli wewnętrznej odpowiadająca 5 dodatkowym próbkom (tj. 600 µl). Nie napełniać do więcej niż 13,92 ml całkowitej objętości (co odpowiada maksymalnej liczbie 111 próbek. Objętości te są charakterystyczne dla próbek Tube 14 ml, 17 x 100 mm polystyrene round-bottom, Becton Dickinson, nr kat. 352051).

Konfiguracja aparatu QIASymphony SP

Szuflada „Waste” (Odpady)

Uchwyt na opakowanie jednostkowe 1–4	Opróżnić opakowania jednostkowe
Uchwyt na worek na odpady	Worek na odpady
Uchwyt na butlę na odpady płynne	Opróżnić i zainstalować butlę na odpady płynne

Szuflada „Eluate” (Eluat)

Statyw elucji	Użyć gniazda 1, pozycja chłodzenia
Objętość elucji*	Wstępnie wybrana objętość elucji: 60 µl Początkowa objętość elucji: 90 µl

* Objętość elucji jest wybrana wstępnie dla danego protokołu. Jest to minimalna dostępna objętość eluatu w końcowej próbce elucji. Początkowa objętość roztworu elucji jest wymagana do zapewnienia właściwej objętości eluatu, równej wcześniej zdefiniowanej wartości.

Szuflada „Reagents and Consumables” (Odczynniki i materiały eksploatacyjne)

Kartridż z odczynnikiem (reagent cartridge, RC), pozycja 1 i 2	Załadować 1 kartridż z odczynnikiem (RC) na maksymalnie 48 próbek lub 2 nowe kartridże z odczynnikiem (RC) na maksymalnie 96 próbek
Uchwyt na statyw na końcówki, pozycje 1–18	Załadować wystarczającą liczbę statywów na jednorazowe końcówki z filtrem, 200 µl i 1500 µl (patrz „Wymagany sprzęt z tworzywa sztucznego dla 1–4 partii próbek”, strona 6)
Uchwyt na opakowanie jednostkowe, pozycja 1–4	Załadować opakowania jednostkowe zawierające kartridże sample prep i zamknięcia 8-Rod Cover (patrz „Wymagany sprzęt z tworzywa sztucznego dla 1–4 partii próbek”, strona 6)

Szuflada „Sample” (Próbka)

Typ próbki	Osocze
Objętość próbki (wliczając w to nadwyżkę)	1200 µl
Probówki	Micro tubes 2,0 ml Type H lub Micro tubes 2,0 ml Type I (Sarstedt, nr kat. 72.693 i 72.694)
Wkład	Tube Insert 3B (nr kat. 9242083)

Wymagany sprzęt z tworzywa sztucznego dla 1–4 partii próbek

	Jedna partia, 24 próbki*	Dwie partie, 48 próbek*	Trzy partie, 72 próbki*	Cztery partie, 96 próbek*
Jednorazowe końcówki z filtrem, 200 µl ^{†‡}	28	52	76	100
Jednorazowe końcówki z filtrem, 1500 µl ^{†‡}	113	206	309	402
Kartridże sample prep [§]	21	42	54	72
Zamknięcia 8-Rod Cover [¶]	3	6	9	12

* Użycie więcej niż jednej probówki z kontrolą wewnętrzną na partię oraz przeprowadzenie więcej niż jednego skanowania inwentaryzującego wymaga dodatkowych jednorazowych końcówek z filtrem.

† Statyw na końcówki zawiera 32 końcówki z filtrem.

‡ Liczba wymaganych końcówek z filtrem obejmuje końcówki z filtrem dla 1 skanowania inwentaryzującego na kartridż z odczynnikami.

§ Opakowanie jednostkowe zawiera 28 kartridży sample prep.

¶ Opakowanie jednostkowe zawiera dwanaście zamknięć 8-Rod Cover.

Konfiguracja aparatu QIASymphony AS

Materiały eksploatacyjne

Podczas konfiguracji pozycje odpowiednie dla każdego materiału eksploatacyjnego w module QIASymphony AS są wyświetlane na ekranie dodatkowym aparatu.

Materiały eksploatacyjne	Nazwa wyświetlona na ekranie dotykowym	Do użytku z adapterem/uchwytem do odczynników
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, 30 ml, Qsym AS (50)*	QIA#997108 *Bottle 30 ml‡	Reagent holder 2 QS
Elution Microtubes CL (24 x 96)	QIA#19588 * EMTR	Elution Microtube Rack QS

* Dla odczynników wchodzących w skład mieszaniny master mix, mieszaniny master mix przygotowanej w systemie, wzorców oznaczenia i kontroli oznaczenia.

† Zamiennie można użyć probówek Sarstedt opisanych w części „Materiały wymagane, ale niedostarczone”, strona 2.

‡ Przyrostek „(m)” widoczny na ekranie dotykowym oznacza, że obliczenia dotyczące poziomu płynu dla stosownej probówki zoptymalizowano pod kątem odczynników tworzących menisk wklęsły.

Adaptory i uchwyty na odczynniki

Statyw/uchwyt na odczynniki	Nazwa	Wymagana liczba[§]
Statyw próbek	Elution Microtube Rack QS	1
Uchwyty na odczynniki	Reagent holder 1 QS	1
Statywy badań	RG Strip Tubes 72 QS	1

[§] Ilość obliczona dla programu oznaczeń z 72 reakcjami.

Końcówki z filtrem

Załadować statywy na końcówki, zaczynając od gniazd na końcówki 1, 2 i 3 w szufladzie „Eluate and Reagents” (Eluat i odczynniki), a następnie załadować statywy na końcówki do gniazd na końcówki 7, 8 i 9 w szufladzie „Assays” (Badania).

Rodzaj materiału eksploatacyjnego	Nazwa wyświetlona na ekranie dotykowym	Minimalna liczba dla 24 reakcji	Minimalna liczba dla 72 reakcji
Filter-Tips, 1500 µl (1024)	1500 µl	4	5
Filter-Tips, 200 µl (1024)	200 µl	9	8
Filter-Tips, 50 µl (1024)	50 µl	25	73
Tip Disposal Bags	–	1	1

Reakcja RT-PCR w aparacie Rotor-Gene Q

Szczegółowe informacje dotyczące protokołu znajdują się we właściwej dla oprogramowania karcie protokołu Konfiguracja w celu uruchomienia zestawów *artus* QS-RGQ Kit (Settings to run *artus* QS-RGQ Kits) pod adresem www.qiagen.com/products/artushbvpcrkitce.aspx.

Ustawienia specyficzne dla zestawu *artus* HBV QS-RGQ Kit

Oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager automatycznie ustawia parametry dla zestawu *artus* HBV QS-RGQ Kit.

Poniżej przedstawiono specyficzne ustawienia obowiązujące podczas używania zestawu z oprogramowaniem Rotor-Gene w wersji 2.1.

Reaction Volume (Objętość reakcyjna) (µl)	50
Hold (Wstrzymanie)	Temperatura wstrzymania: 95 stopni Czas wstrzymania: 10 min
Cycling (Powtarzanie cykli)	45 razy 95 stopni przez 15 sekund 55 stopni przez 30 sekund 72 stopnie przez 15 sekund
Auto-Gain Optimisation Setup (Konfiguracja optymalizacji wzmocnienia automatycznego)	55 stopni (Próbki: kanał zielony; IC: kanał żółty)

Interpretacja wyników

W niniejszej sekcji opisano sposób interpretacji wyników uzyskanych za pomocą aparatu Rotor-Gene Q. W celu analizy pełnego przebiegu pracy, „od próbki do uzyskania wyniku”, należy również przejrzeć informacje dotyczące statusu próbki, które znajdują się w plikach wynikowych aparatów QIASymphony SP/AS. Należy używać wyłącznie próbek, które mają ważny status.

Oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager automatycznie interpretuje wyniki PCR i podaje wnioski oraz wynik ilościowy.

W poniższych sekcjach opisano sposób interpretacji wyników za pomocą oprogramowania Rotor-Gene Q w wersji 2.1 lub wyższej.

Detekcja sygnału i wnioski

Sygnal w zielonym kanale fluorescencyjnym	Sygnal w żółtym kanale fluorescencyjnym	Wynik ilościowy (IU/ml)	Interpretacja
Tak	Tak	<10,22	Wynik ważny: wykryto DNA wirusa HBV, <31,6 IU/ml, oznaczenie ilościowe nie jest możliwe, gdyż wynik ilościowy znajduje się poniżej granicy wykrywalności. Nie można zapewnić odtwarzalności pozytywnych wyników.
Tak	Tak	≥10,22 i <31,6	Wynik ważny: wykryto DNA wirusa HBV, <31,6 IU/ml, oznaczenie ilościowe nie jest możliwe, gdyż wynik ilościowy znajduje się poniżej zakresu liniowego oznaczenia.
Tak	Tak	≥31,6 i ≤2 x 10 ⁷	Wynik ważny: wykryto DNA wirusa HBV w obliczonym stężeniu, wynik ilościowy mieści się w zakresie liniowym oznaczenia.
Tak	Tak	>2 x 10 ⁷	Wynik ważny: wykryto DNA wirusa HBV >2 x 10 ⁷ IU/ml, oznaczenie ilościowe nie jest możliwe, gdyż wynik ilościowy znajduje się powyżej zakresu liniowego oznaczenia.*
Nie	Tak	–	Wynik ważny: Nie wykryto DNA wirusa HBV.†
Nie	Nie	–	Wynik nieważny: Wynik jest niejednoznaczny.‡

* Jeśli požądane jest oznaczenie ilościowe, należy rozcieńczyć próbkę osoczem wolnym od wirusa HBV i ponownie przetworzyć próbkę. Wynik ilościowy uzyskany dla ponownie przetworzonej próbki należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia.

† Jeśli w reakcji wartość C_T dla kontroli wewnętrznej negatywnej próbki przekracza o ponad 3 cykle wartość C_T dla kontroli wewnętrznej kontroli bez matrycy (no template control, NTC) ($C_{T \text{ próbki IC}} - C_{T \text{ IC NTC}} > 3$), wówczas taką próbkę należy traktować jako nieważną. Wynik jest niejednoznaczny.

‡ Informacje dotyczące przyczyn błędów oraz ich rozwiązywania można znaleźć w części „Rozwiązywanie problemów” dokumentu *HBV QS-RGQ Kit — Instrukcja obsługi* (HBV QS-RGQ Kit Handbook).

Konfiguracja wartości progu dla analizy PCR

Doboru optymalnych ustawień wartości progu dla danej kombinacji aparatu Rotor-Gene Q i zestawu *artus QS-RGQ Kit* należy dokonać empirycznie, sprawdzając każdą kombinację oddzielnie, ponieważ jest to wartość względna, zależna od całościowego przebiegu pracy diagnostycznej. Dla pierwszej reakcji PCR wartość progu można ustawić na wstępnym poziomie 0,04. Jednakże wartość tę należy precyzyjnie dostosować poprzez analizę porównawczą kolejnych reakcji. Wartość progu należy ustawić ręcznie tuż powyżej wartości sygnału dla negatywnych kontroli i negatywnych próbek. Średnia wartość progu obliczona na podstawie tych eksperymentów najprawdopodobniej będzie odpowiednia dla większości przyszłych oznaczeń. Jednakże pomimo tego użytkownik powinien regularnie sprawdzać tę wyznaczoną wartość. Wartość progu zwykle mieści się w przedziale 0,03–0,05 i należy ją zaokrąglić do co najwyżej trzech miejsc po przecinku.

Oznaczenie ilościowe

Wzorce ilościowe (HBV RG/TM QS 1–5) z zestawu *artus* HBV QS-RGQ Kit są traktowane jak wcześniej oczyszczone próbki. Stosuje się również tę samą objętość (20 µl). Aby wyznaczyć krzywą wzorcową w aparatach Rotor-Gene Q, należy użyć wszystkich 5 wzorców ilościowych i zdefiniować je w oknie dialogowym „Edit Samples” (Edytuj próbki) w aparacie Rotor-Gene Q jako wzorce o określonych stężeniach (patrz instrukcja obsługi aparatu).

Uwaga: Standardy ilościowe są zdefiniowane w IU/µl*. Aby przekształcić wartości wyznaczone z krzywej wzorcowej na IU/ml materiału próbki, należy skorzystać z poniższego wzoru.

$$\text{Wynik (IU/ml)} = \frac{\text{Wynik (IU/}\mu\text{l)} \times \text{początkowa objętość elucji (90 }\mu\text{l)}^\dagger}{\text{Objętość próbki (ml)}}$$

Zasadą jest wstawienie początkowej objętości próbki do powyższego wzoru. Należy tak postąpić, jeśli przed izolacją kwasu nukleinowego zmianie uległa objętość próbki (np. zmniejszyła się w wyniku odwirowania lub zwiększyła się przez dodanie objętości wymaganej do izolacji).

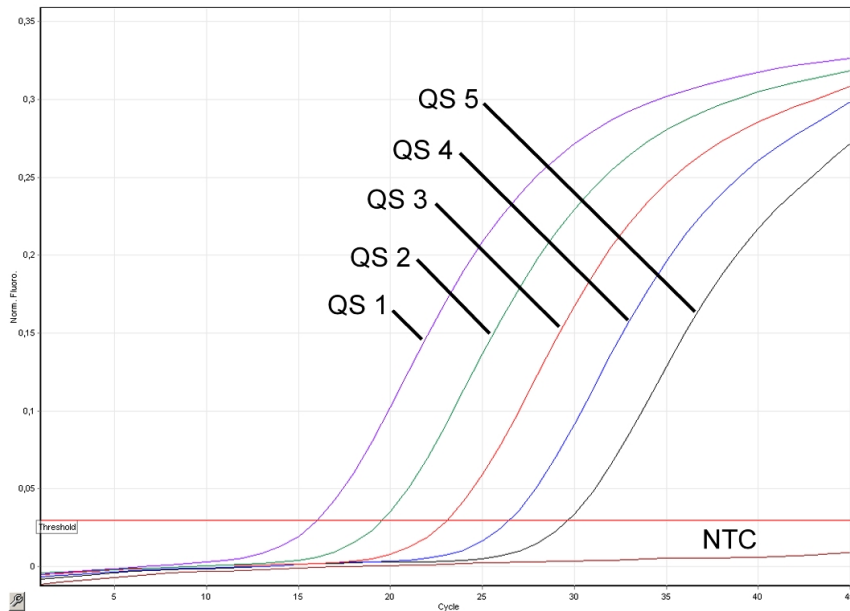
Przelicznik

W przypadku detekcji DNA wirusa HBV za pomocą aparatu Rotor-Gene Q 1 IU/ml odpowiada 8,21 kopii/ml. Przelicznik stanowi wartość przybliżoną wyznaczoną na podstawie średniej wartości przelicznika w obrębie dynamicznego zakresu oznaczenia.

* Wzorzec skalibrowano względem międzynarodowego standardu dla wirusa HBV określonego przez Światową Organizację Zdrowia (World Health Organization, WHO).

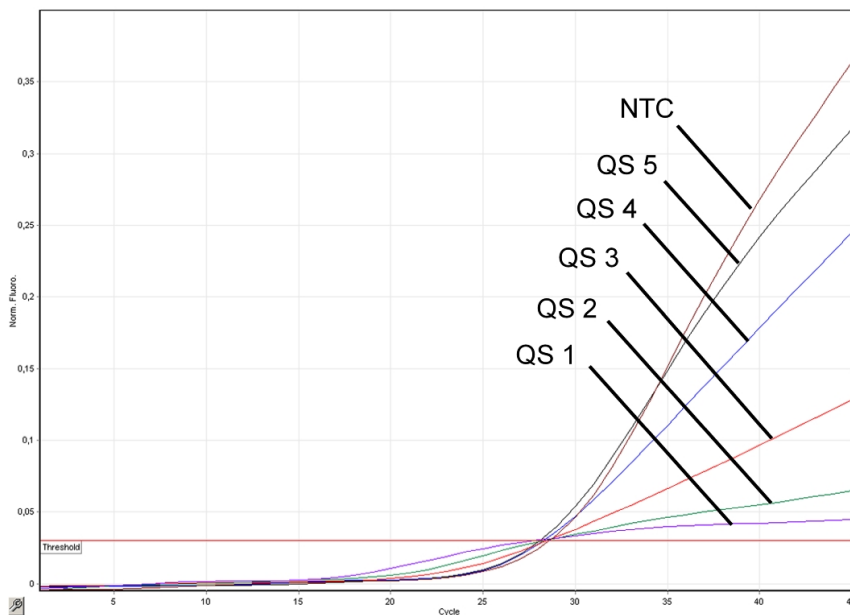
†Obliczenie jest oparte na początkowych objętościach elucji (90 µl).

Przykłady pozytywnych i negatywnych reakcji PCR



Detekcja wzorców ilościowych (HBV RG/TM QS 1–5) w zielonym kanale fluorescencyjnym.

NTC: kontrola bez matrycy (kontrola negatywna).



Detekcja kontroli wewnętrznej (IC) w żółtym kanale fluorescencyjnym z równoczesną amplifikacją wzorców ilościowych (HBV RG/TM QS 1–5). NTC: kontrola bez matrycy (kontrola negatywna).

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu QIAGEN. Instrukcje obsługi lub podręczniki użytkownika zestawu QIAGEN są dostępne w witrynie www.qiagen.com. Można je także zamówić w serwisie lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

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

© 2012 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

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