

2017年9月

QlAsymphony[®] RGQ アプリケーション シート

artus[®] EBV QS-RGQ キット
(サンプル型：血漿)

IVD

CE

REF

4501363JA *artus* EBV QS-RGQ キット、バージョン1



試験の実施前に最新の電子版を
www.qiagen.com/products/artusebypcrkitce.aspx で確認してください。

一般情報

キット	artus EBV QS-RGQ キット、バージョン1 (カタログ番号: 4501363)
検証済みサンプル物質	ヒト EDTA血漿
前処理精製	QIAasymphony DSP Virus/ Pathogen Midi キット (カタログ番号: 937055)
サンプル量 (過剰体積を含む)	1200 µl
アッセイのパラメータセット	artus_EBV_plasma1000_V5 MA_artus_EBV_plasma1000_V5*
アッセイコントロールセット	Cellfree1000_V7_DSP_artus_EBV
溶出液量	60 µl
必要なソフトウェアのバージョン	4.0以上
マスターミックス量	30 µl
プレート量	20 µl
反応数	6~24
ASモジュール上での実行時間	反応数6: 約9分 反応数72: 約35分

* 精製工程やアッセイのセットアップのためにCMV RG IC をロードするための、artus CMV QS-RGQキットでマルチアッセイ実行用プロトコール

キット以外に必要な材料

精製キット

- QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi キット) (カタログ番号: 937055)

QIASymphony SP用アダプタ

- Elution Microtube Rack QS (冷却アダプタ、EMT,v2, Qsym,カタログ番号 : 9020730)
- 転送フレーム
- Tube Insert 3B (チューブインサート3B) (挿入量2.0ml v2, samplecarr. (24) , Qsym, カタログ番号 : 9242083)

QIASymphony SP用消耗品

- Sample Prep Cartridges, 8-well (サンプル調製用カートリッジ、8ウェル) (カタログ番号 : 997002)
- 8-Rod Covers (8ロッドカバー) (カタログ番号 : 997004)
- Filter-Tips (フィルターチップ)、1500 µl (カタログ番号 : 997024)
- Filter-Tips (フィルターチップ)、200 µl (カタログ番号 : 990332)
- Elution Microtubes CL (カタログ番号 : 19588)
- Tip disposal bags (チップ処理袋) (カタログ番号 : 9013395)
- Micro tubes 2.0 ml Type H or Micro tubes 2.0 ml Type I (サンプルおよびインターナルコントロール用マイクロチューブ2.0 ml タイプHまたはマイクロチューブ2.0 mlタイプI) (Sarstedt®, カタログ番号 : 72.693 および 72.694, www.sarstedt.com)

QIASymphony AS用アダプタおよび試薬ホルダ

- Reagent holder 1 QS (試薬ホルダ1 QS) (冷却アダプタ、試薬ホルダ1, Qsym,カタログ番号 : 9018090)
- RG Strip Tubes 72 QS (RGストリップチューブ 72 QS) (冷却アダプタ、RGストリップチューブ72, Qsym, カタログ番号 : 9018092)

QIASymphony AS用消耗品

- Strip Tubes and Caps (ストリップチューブとキャップ)、0.1 ml (カタログ番号 : 981103)
- Tubes, conical, 2 ml, Qsym AS (コニカルチューブ、2 ml, Qsym AS) (カタログ番号 : 997102) またはマイクロチューブ2.0 mlタイプI (Sarstedt、カタログ番号 : 72.694.005)
- または、コニカルチューブ、5 ml, Qsym AS (カタログ番号 : 997104) またはPPからの平台付チューブ (Sarstedt、カタログ番号 : 60.558.001)
- Filter-Tips (フィルターチップ)、1500 µl (カタログ番号 : 997024)
- Filter-Tips (フィルターチップ)、200 µl (カタログ番号 : 990332)
- Filter-Tips (フィルターチップ)、50 µl (カタログ番号 : 997120)
- Tip disposal bags (チップ処理袋) (カタログ番号 : 9013395)

試料の取扱と保管

サンプルの採集	血液サンプル 5-10 ml EDTA血液 8X 留出物混合（攪拌なし） ヒトのヘパリン添加サンプルは使えません。
サンプルの保管	分離：20分間遠心分離、採集後24時間以内に800～1600 × g 滅菌したポリエチレン製チューブへの、隔離した血漿の移動 慣例としてサンプルを冷凍した場合や長期間保存した場合、アッセイの感度は低下することがあります。
サンプルの搬送	飛散防止搬送 24時間以内に出荷 病原体輸送に関する法規制に従った郵送 血液サンプルは冷蔵便（2～8℃）で出荷します。
影響物質	ヘパリン（≥10 IU/ml）によりPCRに影響が生じます。抗凝固薬としてヘパリンを含んだチューブで採集したサンプルや、ヘパリンを投与された患者からのサンプルは使用できません。
サンプルの準備	サンプル内やサンプル上に泡が形成されないように注意してください。 実行前にサンプルは室温（15～25℃）で平衡化してください。

* 国際航空運送協会（IATA）危険物規則書（DGR）

操作手順

Carrier RNAの調製とサンプルへのインターナルコントロールの追加

QIAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi キットをartus EBV QS-RGQキットと組み合わせて使用する場合、サンプルの準備と ダウンストリームアッセイの効率を監視するために精製手順にインターナルコントロールを導入する必要があります。

同じPCR内でEBVとCMVの両方を分析するマルチアッセイ実行時には、精製工程において必ずartus CMV QS-RGQキットのCMV RG ICを使用してください。サンプルの準備とPCRコントロールのアッセイのセットアップには、同じロットからのCMV RG ICを使用してください。ロット番号が違うCMV RG ICは使わないでください。

インターナルコントロールはCarrier RNA (CARRIER) およびバッファー ATE (ATE) の混合物と添加します。インターナルコントロールとCarrier RNA (CARRIER) およびバッファー ATE (ATE) の混合物の合計用量は 120 μ l のままです。

表には、溶出液量 1 μ l あたり 0.1 μ l の割合でのアイソレーションへのインターナルコントロールの添付が記載されています。各実行の直前に新しく混合物を調製することを推奨します。代わりに、QIAsymphony管理コンソール内のツール「IC Calculator」もお使いいただけます。

成分	用量 (μ l) (Sarstedtチューブ) *	用量 (μ l) (Corningチューブ) †
Carrier RNA (CARRIER) の保存	5	5
インターナルコントロール‡	9	9
バッファー AVE	106	106
サンプルあたりの最終用量 (死容積を除く)	120	120
サンプルnの合計用量	$(n \times 120) + 360$ §	$(n \times 120) + 600$ ¶

*マイクロチューブ2.0 ml タイプHとタイプI、Sarstedtのカatalog番号72.693、72.694

† 14 mlチューブ、17 x 100 mm ポリスチレン 丸底型 (Corning® Inc、カATALOG番号: 352051、Becton Dickinsonが元供給業者で、現在はCorning Inc. が本チューブを供給)

‡ インターナルコントロール量は、初回溶出液量 (90 μ l) に基づいて計算します。追加の空隙容積は、使用するサンプルチューブにより異なります。

§ 3個の追加サンプル (360 μ l) に対応するインターナルコントロール混合物が必要となります。合計で 1.92 ml (最大13サンプル相当) を超える量を充填しないでください。マイクロチューブ2.0 ml タイプHとタイプI、Sarstedt (カATALOG番号72.693 と 72.694) を対象とした用量です。

¶ 5個の追加サンプル (600 μ l) に対応するインターナルコントロール混合物が必要となります。合計で 13.92 ml (最大111サンプル相当) を超える量を充填しないでください。14 mlチューブ、17 x 100 mm ポリスチレン 丸底型 (Corning Inc、カATALOG番号: 352051、Becton Dickinsonが元供給業者で、現在はCorning Inc. が本チューブを供給) を対象とした用量です。

QIAasymphony SP のセットアップ

「廃棄物」用引き出し

ユニットボックスホルダ 1~4	空のユニットボックス
処理袋ホルダ	処理袋
廃液ボトルホルダ	廃液ボトルホルダを空にしてから設置します。

「溶出液」用引き出し

溶出液ラック	溶出液マイクロラックQS上の溶出液マイクロチューブCLと転送フレーム スロット1冷却位置を使用します。
溶出液量*	予め選択された溶出液量：60 µl 初回の溶出液量：90 µl

* 溶出液量はプロトコール用に予め選択されています。これは最終溶出液チューブ内でアクセスできる溶出液の最小量です。初回の溶出液量は、実際の溶出液量が予め選択された量と等しくなるために必要です。

「試薬」と「消耗品」用引き出し

RC位置1と2	48までのサンプルに対する1本の試薬カートリッジ (RC)、または96までのサンプルに対する新しい2本の試薬カートリッジ (RC) をロードします。
チップラックホルダ位置1~18	使い捨てフィルターチップ用の十分なラック (200 µl および1500 µl) をロードします (「サンプルバッチ1~4に必要なプラスチック製器具」 ページ7参照)。
ユニットボックスホルダ位置1~4	サンプル調製カートリッジと8ロッドカバーを含めたユニットボックスをロードします (「サンプルバッチ1~4に必要なプラスチック製器具」 ページ7参照)。

「サンプル」の引き出し

サンプル型	ヒト EDTA血漿
サンプル量（過剰体積を含む）	1200 μ l
サンプルチューブ	マイクロチューブ2.0 ml タイプHとタイプI (Sarstedtカタログ番号72.693と72.694)
インサート	チューブインサート3B（カタログ番号： 9242083）

サンプルバッチ1～4に必要なプラスチック製器具

成分	1 バッチ、 24 サンプル*	2 バッチ、 48 サンプル*	3 バッチ、 72 サンプル*	4 バッチ、 96 サンプル*
使い捨てタイプの フィルターチップ、 200 μ l ^{†‡}	28	52	76	100
使い捨てタイプの フィルターチップ、 1500 μ l ^{†‡}	113	206	309	402
サンプル調剤用カー トリッジ [§]	21	42	54	72
8ロッドカバー [¶]	3	6	9	12

* バッチあたり2本以上のインターナルコントロール用チューブを使用してください。インベントリ スキャンを複数回実施する場合、使い捨てフィルターチップを追加する必要があります。

† フィルターチップおよびチップラック32個

‡ 必要なフィルターチップの数には、試薬カートリッジあたりのインベントリースキャン1回分のフィルターチップが含まれます。

§ ユニットボックスあたり28本のサンプル調製カートリッジが付属します。

¶ ユニットボックスあたり12枚の8ロッドカバーが付属します。

QIA Symphony AS のセットアップ

消耗品

セットアップ中、装置のタッチスクリーン上にQIA Symphony AS上の各消耗品の適切な位置が表示されます。

消耗品	タッチスクリーン上の名前	アダプタまたは試薬ホルダ用
ストリップチューブとキャップ、0.1 ml (カタログ番号: 250)	QIA#981103 *ストリップチューブ 0.1	RG ストリップチューブ 72 QS
コニカルチューブ、2 ml、Qsym AS (500) ^{†‡}	QIA#997102 *T2.0 ScrewSkirt [§]	試薬ホルダ1 QS
コニカルチューブ、5 ml、Qsym AS (500) ^{†‡}	QIA#997104 *T5.0 ScrewSkirt [§]	試薬ホルダ1 QS

* バーコード付き冷却アダプタで冷却できる実験器具

[†] マスターミックス部品、システム用マスターミックス、アッセイスタンダード、アッセイコントロール用

[‡] 代わりに「キット以外に必要な材料」のページ2に掲載されているSarstedtの使用も可能

[§] タッチスクリーン内の接尾辞「(m)」は、凹面を形成している試薬のために各チューブの液面が最適かされていることを示します。

アダプタと試薬ホルダ

ラックと試薬ホルダ	名前	必要な数 [†]
試薬ホルダ	試薬ホルダ1 QS	1
サンプルラック	RG ストリップチューブ 72 QS	1

[†] 反応数72でのアッセイのラン用に計算

フィルターチップ

「溶出液と試薬」引き出しの中のチップスロット1、2、3でチップラックのロードを開始して、それから「アッセイ」引き出しのチップスロット7、8、9にチップラックをロードします。

消耗品	タッチスクリーン上の名前	反応数24に対する最小数	反応数72に対する最小数
フィルターチップ、1500 µl (カタログ番号：1024)	1500 µl	4	5
フィルターチップ、200 µl (カタログ番号：1024)	200 µl	9	8
フィルターチップ、50 µl (カタログ番号：1024)	50 µl	25	73
チップ処理袋	-	1	1

Rotor-Gene QでのPCR*

プロトコールの詳細については、ソフトウェアプロトコールシート「*Settings to run artus QS-RGQ Kits (artus QS-RGQキット操作設定)*」 (www.qiagen.com/products/artusebvpcrkitce.aspx) を参照してください。

artus EBV QS-RGQキットの設定

ソフトウェアRotor-Gene®2.1以降との使用により、下記のように設定されます。

反応量 (µl)	50
保持	保持温度 : 95°C 保持時間 : 10分
サイクル	45回 95°C、15秒間 65°C、30秒間 (緑、黄色上で取得して、10 サイクル用にタッチダウン機能を起動) 72°C、20秒間
自動ゲイン最適化の設定	65°C (サンプル : 緑 / IC : 黄色)

マルチアッセイの実行

蛍光チャンネル検出範囲は、PCRチューブ内の蛍光強度に従って決定します。[**New Run Wizard** (新しいウィザードの実行)] ダイアログボックスの**Gain Optimisation** (ゲイン最適化) をクリックして、**Auto-Gain Optimisation Setup** (自動ゲイン最適化の設定) ダイアログボックスを開きます (プロトコールシート*Settings to run artus QS-RGQ Kits*のステップ6とステップ7を参照)。

シングルアッセイの場合、増幅プログラムの焼鈍温度に適合するように較正温度を**65°C**に設定します。同じPCRでEBVとCMVの両方を分析するマルチアッセイの場合、蛍光チャンネルの強度を手動で調整します。

* 適宜、製造日2010年1月以降のRotor-Gene Q 5plex HRMをお使いください。製造日は装置の後ろにあるシリアルナンバーで確認できます。シリアルナンバーは「mmyynnn」形式になっていて、ここで「mm」は製造された月を、「yy」は西暦の製造年の下2桁を、「nnn」は一意的装置識別子を表します。

1. [Edit (編集)] (図1) をクリックして、蛍光チャンネルを編集します。

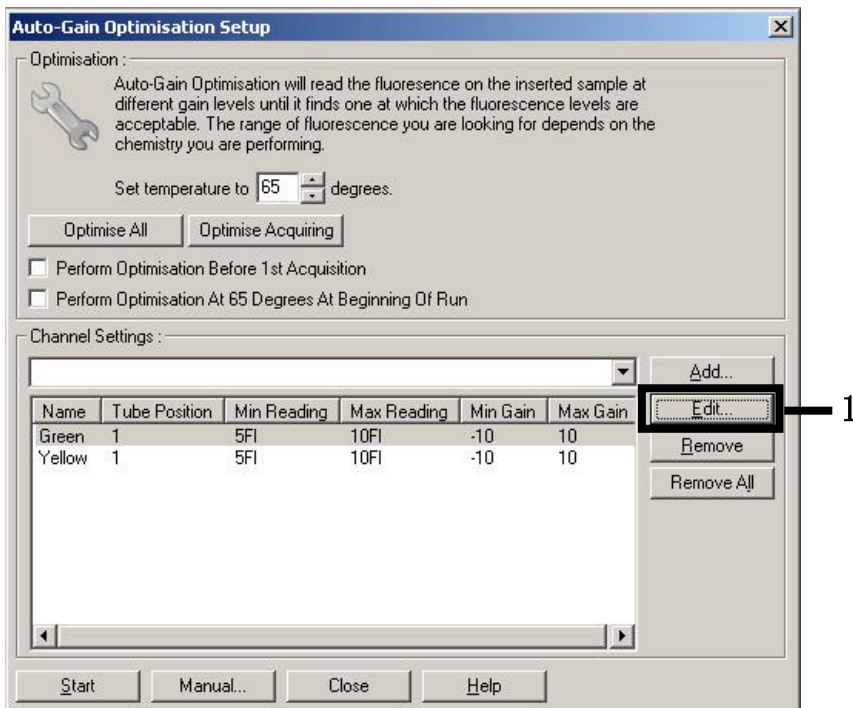


図 1. 手動による蛍光チャンネル強度の調整マルチアッセイ (CMVとEBV) を対象とした複数のチューブ位置で、各蛍光チャンネルの強度を調整します。

2. EBV等の最初の *artus* アッセイ用のチューブ位置を設定します。全蛍光チャンネル用のチューブ位置を設定して、[OK] をクリックします (図2)。

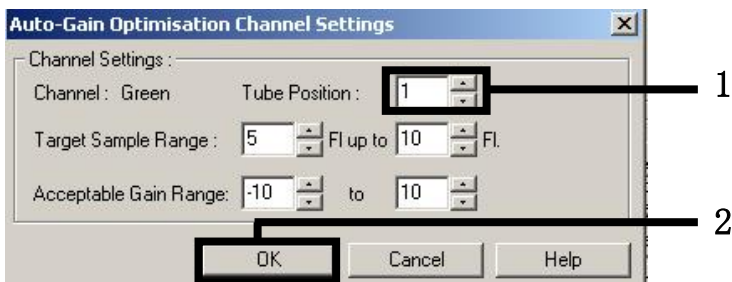


図 2. チューブ位置を設定します。

3. [Start (開始)] をクリックして、最初の artus アッセイのためのゲイン最適化を開始します (図3)。

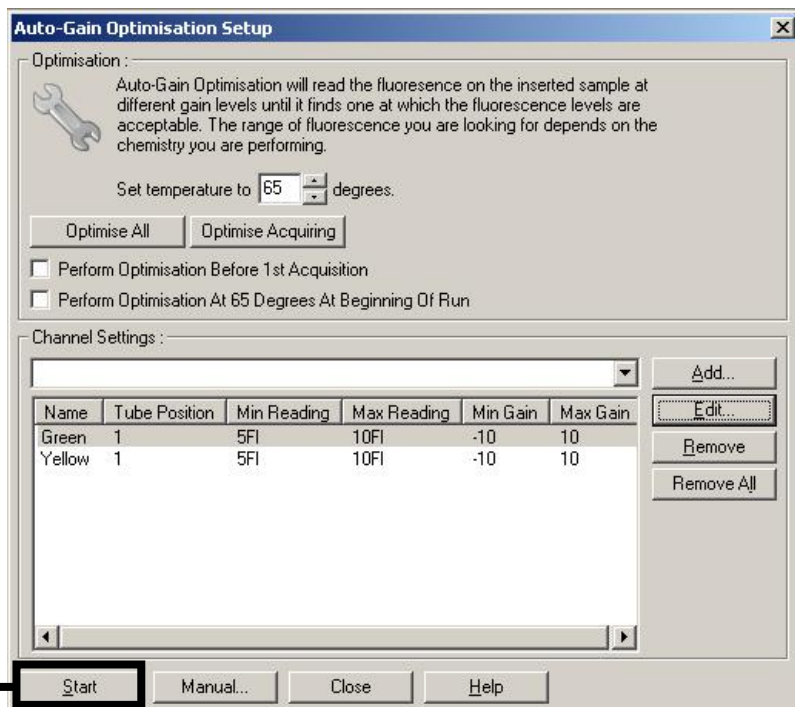


図 3.ゲイン最適化の開始

4. 新しい [Running Auto-Gain Optimisation (自動ゲイン最適化の実行)] ウィンドウが開きます。ウィンドウ (図4) に [Completed (完了)] が表示されるまで待機します。両方のチャンネル用に選択したゲイン値を書き留めてから、[Close (閉じる)] をクリックします (図4)。

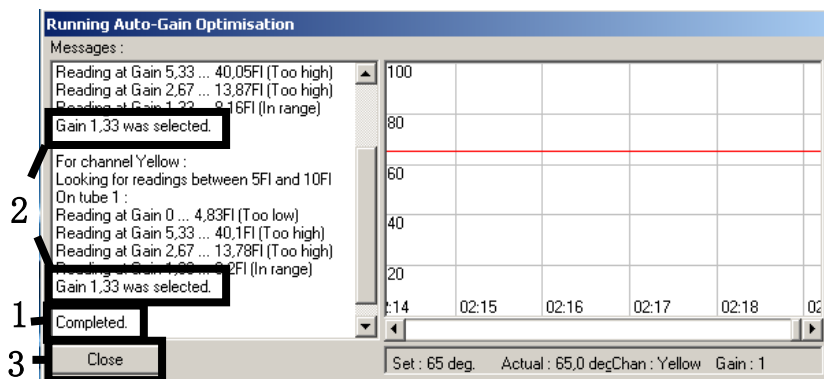


図 4.ゲイン最適化の完了ゲイン値 (この場合、両方の蛍光チャンネルを対象とした1.33) を確認します。

5. CMV等の2番目の *artus* アッセイのチューブ位置のために、ステップ1~4を繰り返します。
6. [Edit Gain (ゲインの編集)] をクリックして、手動でゲイン値を編集します (図5)。

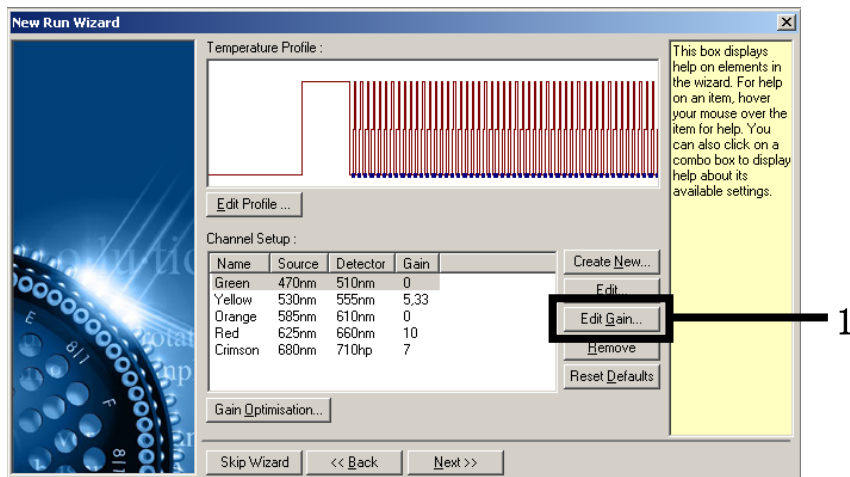


図 5.手動によるゲイン値の編集

7. ステップ4に記載された緑のサイクリングを対象とした最小ゲイン値を選択して、[(Gain for Green) 緑用ゲイン] ウィンドウにこの値を手動で入力します (図6)。ステップ4に記載された黄色のサイクリングを対象とした最小ゲイン値を選択して、[(Gain for Yellow) 黄色用ゲイン] ウィンドウにこの値を手動で入力します (図6)。

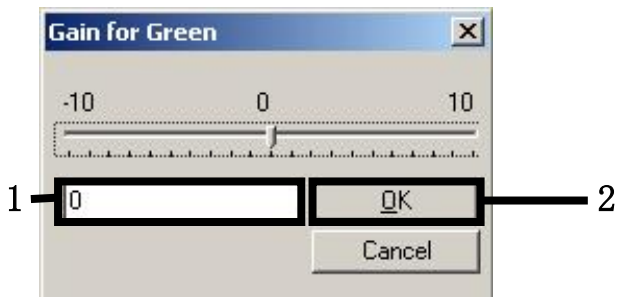


図 6.手動による最小ゲイン値の入力

8. チャネル校正（または手動での割当）により決定したゲイン値は自動的に保存され、プログラミング手順の最後のメニューウィンドウに掲載されます（図7）。[Start Run（実行開始）.] をクリックします。

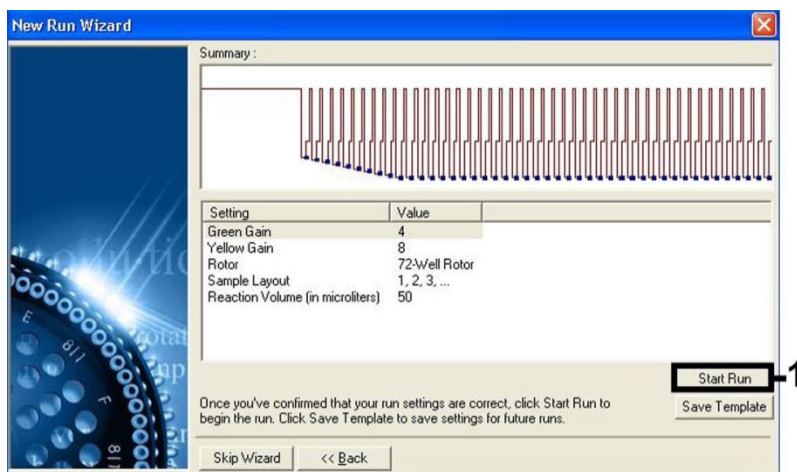


図 7.実行を開始します。

結果の解釈

本項では、Rotor-Gene Q上での結果の解釈について説明します。また、サンプルから結果までの全ワークフロー解析のための QIAasymphony SP/AS 結果ファイルからのサンプルステータス情報も確認します。ステータスが有効なサンプルだけをお使いください。

artus EBV QS-RGQ キットは、Rotor-Gene Q ソフトウェア2.1以上のバージョンでの手動解析により、Rotor-Gene Q上でお使いいただけます。次の項では、Rotor-Gene Q ソフトウェア2.1以上のバージョンを使った結果の解釈についてご説明します。

信号検知と終了 - 血漿

チャンネル内信号 サイクル緑	チャンネル内信号 サイクル黄色	定量的結果 (copies/ml)	解釈
○	○	<157	有効な結果：EBV DNA検知、 <157 copies/ml. 定量的結果が検知限度を下回っているため、計量できません。陽性結果の再現性は保証されません。
○	○	≥157 および <631	有効な結果：EBV DNA検知、 <631copies/ml. 定量的結果がアッセイの線形範囲を下回っているため、計量できません。
○	○ / ×**	≥631 および ≤1 × 10 ⁷	有効な結果：算出された濃度で検知された EBV DNA 定量的結果はアッセイの線形範囲内です。
○	○ / ×**	>1 × 10 ⁷	有効な結果：EBV DNA検知、 >1 × 10 ⁷ copies/ml. 定量的結果がアッセイの線形範囲を上回っているため、計量できません。*
×	○	-	有効な結果：EBV DNAは検知できません。†
×	×	-	無効な結果：結果は得られません。‡

* 計量が必要な場合、サンプルをEBVが含まれていない血漿で希釈して再処理します。再処理したサンプルからの定量的結果に希釈係数を掛けます。

† 陰性サンプルのインターナルコントロールのC_T値が (C_{T IC Sample} - C_{T IC NTC} >3) 内のテンプレートを含まないコントロール (NTC) のインターナルコントロールのC_T値より3サイクル以上高い場合、サンプルは無効として扱われます。結果は得られません。

‡ 誤差原因とその解決策に関する情報は、artus EBV QS-RGQ Kit Handbookの「トラブルシューティングガイド」に掲載されています。

** この場合、EBV DNA (サイクル緑チャンネルの正の信号) の初回高濃度により、サイクル黄色チャンネル内のインターナルコントロールの蛍光信号が減少または消失する可能性があるため、サイクル黄色チャンネル内の信号の検知は不要です。

PCR解析用閾値の設定

Rotor-Gene Q 装置と *artus* QS-RGQ キットの組み合わせ用の最適な閾値は、診断ワークフロー全体に応じた相対値であるため、各組み合わせの試験に基づいて設定します。初回のPCR解析時には、閾値は予備値「0.04」に設定できますが、この値は次のワークフロー実行の比較解析において微調整する必要があります。閾値は、手動で負のコントロールと陰性サンプルのバックグラウンド信号の真上に設定します。実験から計算された平均閾値は今後の実行の大部分で有効となる可能性が高いけれど、生成された閾値は定期的な頻度で確認する必要があります。通常、閾値は 0.03~0.05の範囲内で、小数点以下第三位は四捨五入します。

定量化

artus EBV QS-RGQ キットの定量用スタンダード (EBV QS 1-4) は、既に精製されたサンプルとして扱われ、同じ用量 (20 µl) が使用されます。Rotor-Gene Q 装置上に検量線を作成するには、4つの定量化スタンダード全部を使い、指定した濃度でのスタンダードとして Rotor-Gene Q 装置の [Edit Samples (サンプルの編集)] で定義する必要があります。

注意: 定量スタンダードは、溶出液内の copies/µl として定義されます。下記の方程式を適用して、検量線で決定した値をサンプルの copies/ml に変換します。

$$\text{サンプルにおける結果 (copies/ml)} = \frac{\text{溶出量の結果 (copies/}\mu\text{l)} \times \text{初回の溶出液量 (90 }\mu\text{l)}^*}{\text{サンプル用量 (ml)}}$$

原則として、初回サンプル用量を、上記の方程式に入力します。核酸の抽出前にサンプル用量が変更された場合 (例: 遠心分離による減量やアイソレーションに必要な量の追加による増量)、この点を考慮する必要があります。

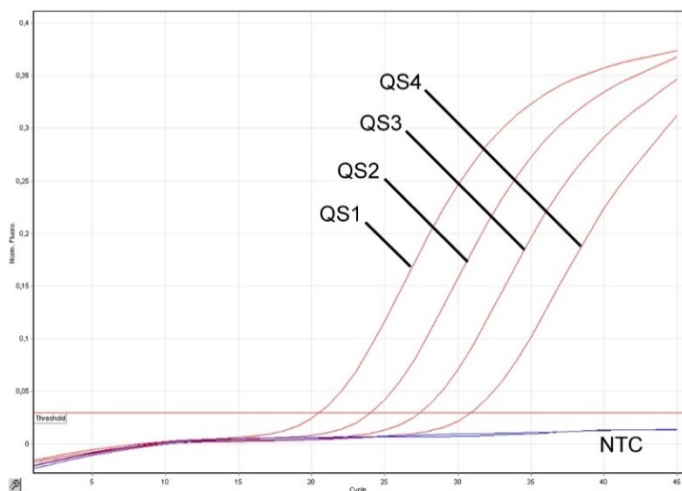
同じPCRでEBVとCMVの両方を分析するマルチアッセイの場合、必ず対応する定量化スタンダードでそれぞれ CMV 用と EBV 用にサンプルを個別に解析してください。

* 初回溶出液量 (90 µl) に基づいて計算します。

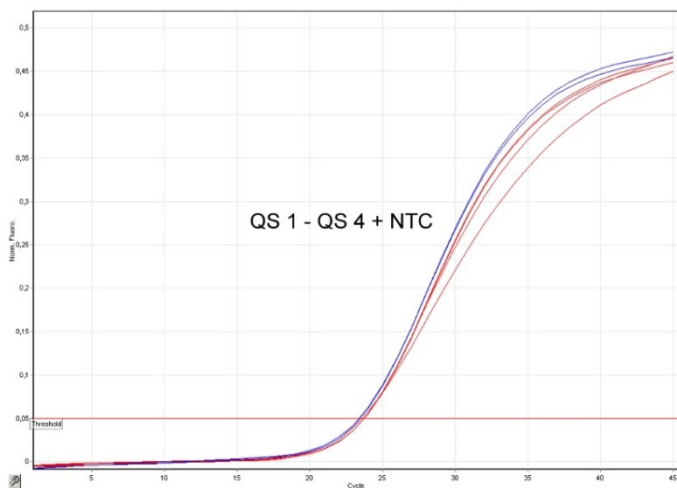
換算係数

1 copy/ml は、Rotor-Gene Q上でのヒトEDTA血漿からのEBV DNA検知における 0.142 lu/ml に相当します。本アプリケーションシートに記載された検証済みワークフローに従う場合、この換算係数を適用します。換算係数は、アッセイの動的範囲における平均係数に基づいた概数です。

PCR陽性反応と陰性反応の例



蛍光チャネル「サイクル緑」における定量スタンダード (EBV QS 1-4) の検知 NTC : テンプレートを含まないコントロール (負の制御)



定量スタンダード (EBV QS 1-4) の同時増幅による、蛍光チャネル「サイクル黄色」内のインターネルコントロール (IC) の検知 NTC : テンプレートを含まないコントロール (負の制御)

文書改訂履歴

2017年9月

換算係数に関する情報の追加 (IU/mlへのコピー) 「ひとつのASで216 までのアッセイのセットアップが可能」という脚注の削除
QS-SP/AS上での最大72反応のセットアップに必要な材料の変更
EBV でのマルチアッセイ実行用材料の使用法 (CMV IC使用) に関する詳細の追加「操作手順」の項に、Carrier RNAと JC調製用のソフトウェア「QIASymphony管理コンソール」の使用法に関する情報を追加
実験機器のメーカーを Becton Dickinson から Corning に変更
RGQ実行設定 (タッチダウン、取得機能の利用) の明記「病原体陽性とIC 陰性」のケースを含めた結果の解釈に関する情報の追加
Rotor-Gene AssayManagerの使用法に関する説明の削除
線形範囲値の更新に伴う、定量的結果の限界の変更
定量計算における溶出液とサンプル濃度の違いの明確化
前処理精製リストを採用
QIASymphony プロトコールの「アッセイパラメータの設定」を V4 から V5 へ、「デフォルトのアッセイコントロール設定」を V6 から V7 へバージョンアップ

最新のライセンス情報と製品ごとの免責事項については、該当する QIAGEN キット Handbook またはユーザーマニュアルを参照してください。QIAGEN キット Handbook とユーザーマニュアルは www.qiagen.com から取得でき、もしくは QIAGEN テクニカルサービスないしは各地の代理店でご用意いたします。

商標: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, *artus*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); BD™ (Becton, Dickinson and Company); Corning® (Corning Inc.); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.). 本文書で使用した登録済みの名称、商標などは、具体的な表示がない場合であっても法的保護の対象から外れることを意味しません。
09/2017 HB-0357-S02-002
© 2012-2017 QIAGEN, all rights reserved

注文 www.qiagen.com/shop | テクニカルサポート support.qiagen.com | ウェブサイト www.qiagen.com