

Scheda di Applicazione QIASymphony RGQ *artus*[®] CT/NG QS-RGQ Kit (tipo di campione: urina stabilizzata in eNaT[™], 400 µl)

Luglio 2017

Gestione della versione

Il presente documento riguarda la Scheda di Applicazione del kit *artus* CT/NG QS-RGQ per urina, versione 1, R3.



Prima di eseguire il test verificare la disponibilità di nuove revisioni delle etichette elettroniche nel sito www.qiagen.com/products/artuscngqsrqgkitce.

Informazioni generali

Kit	<i>artus</i> CT/NG QS-RGQ Kit, versione 1, REF 4569365
Campioni convalidati	Urina femminile e maschile stabilizzata in eNaT
Purificazione front-end	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (cat. n° 937055)
Volume del campione (compreso il volume in eccesso)	500 µl
Set di Parametri del Test	<i>artus</i> _CT_NG 400_V1
Set di Controllo del Test predefinito	Complex400_V4_DSP <i>artus</i> CT_NG
Nome del controllo interno sul modulo SP	Complex400_V4_DSP <i>artus</i> CT_NG
Volume di eluizione	60 µl
Versione del software necessaria	Versione 4.0 o superiore
Volume miscela master	10 µl
Volume template	15 µl
Numero di reazioni	6-96
Durata esecuzione su modulo AS	Per 6 reazioni: circa 8 minuti Per 72 reazioni: circa 35 minuti

Materiale necessario ma non in dotazione

Raccolta dei campioni	■	2 ml eNaT tubes (Provette eNaT da 2 ml) (Copan, cat. n° 606C, www.copaninnovation.com)
Kit di purificazione	■	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (Kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi) (cat. n° 937055)
Adattatori per QIASymphony SP	■	Elution Microtube Rack QS (Rack QS per microprovette di eluizione) (Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym (adattatore di raffreddamento, EMT, v2, Qsym), cat. n° 9020730)
	■	Tube Insert 3B (Insero provetta 3B) (Insert, 2.0ml v2, samplecarr. (Insero, 2,0 ml v2, portacamp.) (24), Qsym, cat. n° 9242083)
Materiali di consumo per QIASymphony SP	■	Sample Prep Cartridges, 8-well (Cartucce di preparazione dei campioni, 8 pozzetti) (cat. n° 997002)
	■	8-Rod Covers (Coperchi per 8 barre) (cat. n° 997004)
	■	Filter-Tips (Puntali con filtro), 1.500 µl (cat. n° 997024)
	■	Filter-Tips (Puntali con filtro), 200 µl (cat. n° 990332)
	■	Elution Microtubes CL (Microprovette di eluizione CL) (cat. n° 19588)
	■	Tip disposal bags (Sacchetti per smaltimento puntali) (cat. n° 9013395)
	■	Micro tubes 2.0 ml Type I, with skirted base (Microprovette da 2,0 ml di tipo I, con base flangiata) (Sarstedt, cat. n° 72.694, www.sarstedt.com) da usare con campioni e controlli interni
	■	Tubes 14 ml, 17 x 100 mm polystyrene round-bottom (Provette da 14 ml, 17 x 100 mm, in polistirene a fondo tondo) (Becton Dickinson, cat. n° 352051) per controlli interni
Adattatori e portareagenti per QIASymphony AS	■	Reagent holder 1 QS (Portareagenti 1 QS) (Cooling Adapter, Reagent Holder 1, Qsym (Adattatore di raffreddamento, portareagenti 1, Qsym), cat. n° 9018090)
	■	Reagent holder 2 QS (Portareagenti 2 QS) (Cooling Adapter, Reagent Holder 2 (Adattatore di raffreddamento, portareagenti 2, Qsym), cat. n° 9018089)
	■	RG Strip Tubes 72 QS (Provette per strisce RG 72 QS) (Cooling Adapter, RG Strip Tubes 72, Qsym (Adattatore di raffreddamento, provette per strisce RG 72), Qsym, cat. n° 9018092)

Materiali di consumo per QIASymphony AS	■	Strip Tubes and Caps (Provette per strisce e tappi), 0,1 ml (cat. n° 981103)
	■	Tubes, conical, 2 ml, Qsym AS (Provette a fondo conico da 2 ml, Qsym AS) (cat. n° 997102)
	■	Tube, conical, 5 ml, Qsym AS (Provette a fondo conico da 5 ml, Qsym AS) (cat. n° 997104)
	■	Elution Microtubes CL (Microprovette di eluizione CL) (cat. n° 19588)
	■	Filter-Tips (Puntali con filtro), 1.500 µl (cat. n° 997024)
	■	Filter-Tips (Puntali con filtro), 200 µl (cat. n° 990332)
	■	Filter-Tips (Puntali con filtro), 50 µl (cat. n° 997120)
	■	Tip disposal bags (Sacchetti per smaltimento puntali) (cat. n° 9013395)
Per la preparazione dei campioni (eNaT)	■	Buffer ATL, GPR (Tampone ATL, GPR) (cat. n° 939016)

Conservazione e manipolazione dei campioni

Raccolta dei campioni	2 ml ENaT tubes (Provette eNaT da 2 ml) (Copan, cat. n° 606C, www.copaninnovation.com)
Trasporto dei campioni	Trasporto di materiale fragile Spedizione a 20°C entro 6 ore dalla raccolta dei campioni Spedizione per posta in conformità alle istruzioni legali per il trasporto di materiali patogeni*
Preparazione dei campioni	Evitare la formazione di schiuma all'interno o sui campioni. I campioni devono essere termostatati a temperatura ambiente (15-25°C) prima di avviare la procedura.
Conservazione dei campioni	A breve termine (fino a 7 giorni dall'arrivo al sito di analisi): 20°C o 4°C in funzione delle condizioni locali A lungo termine (fino a 2 settimane): 4°C Conservazione prolungata: -20°C

* International Air Transport Association (IATA) (Associazione Internazionale per il Trasporto Aereo). Dangerous Goods Regulations (Regolamenti relativi alle merci pericolose).

Procedura

Preparazione del carrier RNA e aggiunta del controllo interno ai campioni

L'utilizzo del kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi in combinazione il kit *artus* CT/NG QS-RGQ richiede l'inserimento del controllo interno (CT/NG RG IC) nella procedura di purificazione per monitorare l'efficienza della preparazione dei campioni e del test a valle.

I controlli interni vanno aggiunti alla miscela di carrier RNA (CARRIER)–tampone AVE (AVE); il volume totale della miscela controllo interno–carrier RNA (CARRIER)–tampone AVE (AVE) deve rimanere di 120 µl.

La tabella descrive l'aggiunta del controllo interno all'isolamento nel rapporto di 0,1 µl per 1 µl di volume di eluizione. Si consiglia di preparare miscele fresche per ogni processo di analisi subito prima dell'uso.

Per il calcolo del controllo interno (IC) si raccomanda di utilizzare l'“IC Calculator” (Calcolatore CI) inserito nella QIASymphony Management Console (QMC).

Componente	Volume (µl) (provette SAR)*	Volume (µl) (provette BD™)†
Soluzione madre con carrier RNA (CARRIER)	3	3
Controllo interno‡	9	9
Tampone AVE	108	108
Volume finale per campione (volume morto escluso)	120	120
Volume totale per n campioni	$(n \times 120) + 360^§$	$(n \times 120) + 600^¶$

* Microprovette da 2,0 ml di tipo I, con base flangiata (Sarstedt, cat. n° 72.694, www.sarstedt.com).

† Provette da 14 ml, 17 x 100 mm, in polistirene a fondo tondo (Becton Dickinson, cat. n° 352051).

‡ Il calcolo della quantità di controllo interno è basato sui volumi di eluizione iniziali (90 µl). Il volume aggiuntivo a vuoto dipende dal tipo di provetta per campione utilizzata.

§ È necessaria una miscela di controllo interno corrispondente a 3 campioni supplementari (ossia 360 µl). Non riempire per un volume totale superiore a 1,92 ml (corrispondente ad un massimo di 13 campioni). Questi volumi sono specifici di microprovette da 2,0 ml di tipo I, con base flangiata (Sarstedt, cat. n° 72.694, www.sarstedt.com).

¶ È necessaria una miscela di controllo interno corrispondente a 5 campioni supplementari (ossia 600 µl). Non riempire per un volume totale superiore a 13,92 ml (corrispondente ad un massimo di 111 campioni). Questi volumi sono specifici di provette da 14 ml, 17 x 100 mm, in polistirene a fondo tondo (Becton Dickinson, cat. n° 352051).

Setup di QIASymphony SP

Cassetto "Waste" (Materiali di scarto)

Supporto per box unitari 1-4	Box unitari vuoti
Supporto per sacchetto dei materiali di scarto	Sacchetto dei materiali di scarto vuoto
Supporto per contenitore dei residui liquidi	Svuotare e installare il contenitore dei residui liquidi

Cassetto "Eluate" (Eluito)

Rack per eluizione	(Rack EMT) Utilizzare l'apertura 1, posizione di raffreddamento
Volume di eluizione*	Volume eluizione preselezionato: 60 µl Volume di eluizione iniziale: 90 µl

* Il volume di eluizione è preselezionato per il protocollo. Si tratta del volume accessibile minimo di eluito nella provetta di eluizione finale. Il volume iniziale della soluzione di eluizione necessaria per garantire il volume effettivo di eluito è identico al volume preselezionato.

Cassetto "Reagents and Consumables" (Reagenti e materiali di consumo)

Posizione A1 e/o A2	Caricare 1 cartuccia reagenti (RC) per max. 72 campioni o 2 cartucce reagenti nuove (RC) per max. 144 campioni
Posizione B1	Tampone ATL (ATL); scansionare il codice a barre del flacone premendo il pulsante "Bottle ID" (ID flacone) all'interno del cassetto "Reagent and Consumable"
Supporto per rack per puntali posizioni 1-17	Caricare un sufficiente numero di rack per puntali con filtro monouso, 200 µl e 1.500 µl (vedere pag. 7)
Supporto per box unitari posizioni 1-4	Caricare box unitari contenenti cartucce per la preparazione dei campioni e coperchi per 8 barre (vedere pag. 7)

Cassetto "Sample" (Campione)

Tipo di campione	Mezzo di trasporto eNaT
Volume del campione (compreso il volume in eccesso)	500 µl
Provette per campioni (primarie)	2 ml eNaT tubes (Provette eNaT da 2 ml) (Copan, cat. n° 606C, www.copaninnovation.com)*
Provette per campioni (secondarie)	Micro tubes 2.0 ml Type I, with skirted base (Microprovette da 2,0 ml di tipo I, con base flangiata) (Sarstedt, cat. n° 72.694, www.sarstedt.com)
Inserto	Tube Insert 3B (Inserto provetta 3B (cat. n° 9242083)

* Accertarsi di rimuovere i tamponi dalle provette primarie prima di caricarli sullo strumento QIASymphony SP.

Plastica da laboratorio necessaria per lotti da 1-4 campioni

	Un lotto, 24 campioni*	Due lotti, 48 campioni*	Tre lotti, 72 campioni*	Quattro lotti, 96 campioni*
Puntali con filtro monouso, 200 µl†	28	52	74	100
Puntali con filtro monouso, 1.500 µl††	93	178	263	348
Cartucce per la preparazione dei campioni§	18	36	54	72
Coperchi per 8 barre¶	3	6	9	12

* L'impiego di più di una provetta di controllo interno per lotto e l'esecuzione di più di una scansione di inventario richiedono ulteriori puntali con filtro monouso.

† Ci sono 32 puntali con filtro su ogni rack per puntali.

†† La quantità di puntali con filtro necessari include i puntali con filtro per 1 scansione di inventario per ogni cartuccia reagenti.

§ Ci sono 28 cartucce per la preparazione dei campioni in ogni box unitario.

¶ Ci sono dodici coperchi per 8 barre in ogni box unitario.

Caricamento dei campioni e dei controlli

Accertarsi che i 2 controlli (controllo CT/NG CT+/NG- e controllo CT/NG NG+/CT-) vengano collocati all'inizio dei campioni nel modulo di ingresso campioni del QIASymphony. Se si preparano più di 69 campioni occorre utilizzare altri 2 controlli (vedere la tabella sottostante a titolo di esempio). Ciò è importante perché un'analisi PCR contiene 72 reazioni (69 campioni + 2 controlli nei moduli di preparazione dei campioni e 1 NTC nel modulo di setup del test). Se si analizzano più di 69 campioni, il modulo AS esegue automaticamente una seconda analisi PCR. Per garantire la validità di questo processo è necessario che 2 controlli siano nelle posizioni PCR 1 e 2. Accertarsi pertanto che i 2 controlli per la preparazione dei campioni siano sempre all'inizio del processo sul Rotor-Gene Q. Se si analizzano più di 45 campioni, consigliamo di dividere i campioni in 2 lotti sul modulo AS e, di conseguenza, in 2 processi

separati sul RotorGene Q MDx 5plex HRM. Per maggiori informazioni, consultare le 2 tabelle riportate di seguito. Si rammenta che il NTC viene processato dal modulo AS, ma non dal modulo SP.

Nota: Si raccomanda di non modificare manualmente il numero di replicati NTC. Il Rotor-Gene AssayManager rifiuta di eseguire il processo se il numero di replicati NTC è stato modificato.

Distribuzione dei campioni e dei controlli (esempio per 96 reazioni)

	Lotto SP 1	Lotto SP 2	Lotto SP 3	Lotto SP 4
	Posizioni	Posizioni	Posizioni	Posizioni
Controlli CT/NG	1: CT+/NG-	-	49: CT+/NG-	-
	2: NG+/CT-		50: NG+/CT-	
Campioni	3-24	25-48	51-72	73-96

Dopo ogni serie di campioni (1-71 e 72-96) il modulo AS aggiunge un campione NTC (No Template Control, ossia controllo no template).

La seguente tabella illustra il flusso di lavoro consigliato per 96 campioni (inclusi i controlli). In questo esempio vengono processati 2 x 46 campioni (+ 2 controlli) in 2 lotti AS e 2 processi PCR. La prima analisi PCR, con 46 campioni, 2 controlli e 1 NTC, viene terminata mentre sono in corso di processazione i lotti SP 3 e 4.

Flusso di lavoro consigliato per 96 campioni utilizzando il processo integrato

	Lotto AS 1		Lotto AS 2	
	Lotto SP 1	Lotto SP 2	Lotto SP 3	Lotto SP 4
	Posizioni	Posizioni	Posizioni	Posizioni
Controlli CT/NG	1: CT+/NG-	-	49: CT+/NG-	-
	2: NG+/CT-		50: NG+/CT-	
Campioni	3-24	25-48	51-72	73-96

Setup di QIASymphony AS

Materiali di consumo

Durante il setup, le rispettive posizioni di ogni materiale di consumo sul modulo QIASymphony AS sono indicate sul touch screen dello strumento.

Materiali di consumo	Nome sul touch screen	Da utilizzare con adattatore/portareagenti
Provette per strisce e tappi, 0,1 ml (250)	QIA#981103 *StripTubes 0.1	Provette per strisce RG 72 QS
Provette a fondo conico da 2 ml, Qsym AS (500) [†]	QIA#997102 *T2.0 ScrewSkirt [§]	Portareagenti 1 QS Portareagenti 2 QS
Provetta a fondo conico da 5 ml, Qsym AS (500) ^{††}	QIA#997104 *T5.0 ScrewSkirt [§]	Portareagenti 1 QS Portareagenti 2 QS
Microprovette di eluizione CL (24 x 96)	QIA#19588 * EMTR	Rack QS per microprovette di eluizione

* Indica il materiale da laboratorio che può essere raffreddato utilizzando un adattatore di raffreddamento con codice a barre.

[†] Per componenti della miscela master, miscela master preparata dal sistema, standard del test e controlli del test.

^{††} In alternativa si possono utilizzare provette a fondo conico da 2 ml, Qsym AS (cat. n° 997102).

[§] Il suffisso "(m)" sul touch screen indica che i calcoli del livello di liquido per la rispettiva provetta sono stati ottimizzati per i reagenti che formano un menisco concavo.

Adattatori e portareagenti

Rack/portareagenti	Nome	Numero necessario*
Rack per campioni	Rack QS per microprovette di eluizione	1
Portareagenti	Portareagenti 1 QS	1
Rack per test	Provette per strisce RG 72 QS	1

* Calcolato per un processo di analisi con 72 reazioni.

Puntali con filtro

Caricare i rack per puntali iniziando con le aperture 1, 2 e 3 nel cassetto "Eluate and Reagents" (Eluito e reagenti), poi caricare i rack per puntali nelle aperture 7, 8 e 9 del cassetto "Assays" (Test).

Materiale di consumo	Nome sul touch screen	Numero minimo per 24 reazioni	Numero minimo per 72 reazioni
----------------------	-----------------------	-------------------------------	-------------------------------

Puntali con filtro, 1.500 µl (1024)	1.500 µl	2	2
Puntali con filtro, 200 µl (1024)	200 µl	6	6
Puntali con filtro, 50 µl (1024)	50 µl	24	72
Sacchetti per smaltimento puntali	–	1	1

Divisione della miscela master

Sebbene il kit sia ottimizzato per 2 x 48 reazioni, sono possibili diverse combinazioni. Poiché i sistemi di dispensazione automatici presentano sempre un determinato volume morto, una provetta per 48 reazioni divisa non contiene 2 x 24 reazioni. Vedere la tabella sottostante per una panoramica delle combinazioni possibili.

Componente/i	Provette per miscela master	Analisi PCR	Reazioni per analisi PCR*	Campioni paziente	Controlli†
Provetta per 2 x 48 reazioni	2	2	49	2 x 46	2 x 3
Provetta per 1 x 48 reazioni	1	1	49	1 x 46	1 x 3
Provetta per 1 x 48 reazioni	1	2	17	2 x 14	2 x 3

* Calcolate come n campioni paziente + 2 controlli CT/NG (CT+/NG- e NG+/CT-) + 1 NTC per analisi PCR.

† Controllo CT/NG CT+/NG-, controllo CT/NG NG+/CT- e NTC (aggiunto dal modulo di setup del test).

RT-PCR sul Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM*

Il kit *artus* CT/NG QS-RGQ può essere eseguito sul Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM utilizzando l'analisi manuale con il software Rotor-Gene Q 2.1 o versione superiore oppure utilizzando l'analisi automatica con il Rotor-Gene AssayManager®. Le sezioni che seguono descrivono le impostazioni e il setup utilizzando i 2 diversi pacchetti software.

Preparare il rotore per il processo sullo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM:

- Posizionare un rotore a 72 pozzetti sul relativo supporto.
- Riempire il rotore con le provette per strisce. Accertarsi di iniziare dalla posizione 1 e di riempire le provette nell'orientamento corretto.

* Se applicabile, strumento Rotor-Gene Q 5plex HRM con data di produzione pari o successiva a gennaio 2010. La data di produzione può essere ricavata dal numero di serie sul retro dello strumento. Il numero di serie è nel formato "mmaann", dove "mm" sta per il mese di produzione in cifre, "aa" per le ultime due cifre dell'anno di produzione e "nnn" per l'identificatore univoco dello strumento.

- Utilizzare provette per strisce vuote con tappo per riempire tutte le posizioni non utilizzate.
- Collegare l'anello di bloccaggio.
- Caricare il rotore e l'anello di bloccaggio sul Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

RT-PCR utilizzando il Rotor-Gene AssayManager

Per l'analisi automatica utilizzando il kit *artus* CT/NG QS-RGQ con il Rotor-Gene AssayManager, occorre installare sul Rotor-Gene AssayManager il plug-in di base *artus* V1.0.3 (disponibile per il download da www.qiagen.com/shop/automated-solutions/accessories/rotor-gene-assaymanager).

Avviare il processo d'installazione cliccando due volte sul file *ArtusBasic.Installation.msi* e seguire le istruzioni di installazione. Per una descrizione dettagliata, consultare la sezione "Installazione dei plug-in" nel manuale utente dell'applicazione core del Rotor-Gene AssayManager (*Rotor-Gene AssayManager Core Application User Manual*).

Per utilizzare il profilo di dosaggio *artus_CTNG_sample400_QS* (nome abbreviato: *CTNG_a*) con il kit *artus* CT/NG QS-RGQ occorre importare nel Rotor-Gene AssayManager il file *AP_artus_CTNG_sample400_QS_V2_0_0.iap* (disponibile per il download da www.qiagen.com/products/artusctngqsrqgkitce).

Per importare il profilo di dosaggio nel Rotor-Gene AssayManager:

1. Entrare in "Configuration Environment" (Ambiente di configurazione) e passare alla scheda "Assay Profile" (Profilo di dosaggio).
2. Fare clic su "Import" (Importa) e selezionare il file *AP_artus_CTNG_sample400_QS_V2_0_0.iap* nella finestra di dialogo aperta.
3. Fare clic su "Open" (Apri) e il profilo viene caricato e aggiunto all'elenco dei profili del test disponibili.

Nota: non è possibile importare due volte la stessa versione di un profilo del test.

Avvio di un processo con il Rotor-Gene AssayManager

Dopo avere installato il plug-in e importato il profilo del test, il Rotor-Gene AssayManager può utilizzare le informazioni fornite nel file dei risultati del QIASymphony AS per impostare un processo per l'amplificazione della PCR in tempo reale e la successiva interpretazione automatica dei risultati.

I file dei risultati del QIASymphony AS possono essere scaricati utilizzando una penna USB oppure la QIASymphony Management Console. Se si utilizza una penna USB per scaricare il file dei risultati del QIASymphony AS, questo viene salvato nel forma .zip nella cartella x:\Log\results\AS.

Nota: Prima di importare il file dei risultati del QIASymphony AS occorre decomprimere il file .zip. Questa operazione non è invece necessaria se il file dei risultati del QIASymphony AS viene trasferito utilizzando la QIASymphony Management Console (QMC).

Per eseguire un'analisi PCR:

1. Avviare il Rotor-Gene AssayManager.
2. Entrare nell'ambiente "Setup" (Preparazione) e selezionare la sorgente "QIASymphony" come "Import type" (Tipo di importazione). Nella finestra di dialogo "Select file" (Seleziona file), aprire il corrispondente file dei risultati del QIASymphony AS e fare clic su "Open". L'elenco di lavoro viene così aggiunto alla lista degli elenchi di lavoro disponibili.
3. Il processo può essere avviato dalla tabella "Available work lists" (Elenchi di lavoro disponibili) cliccando su "Apply" (Applica) nella barra dei pulsanti sulla corrispondente voce dell'elenco di lavoro (inserire la denominazione degli elenchi di lavoro QS importati).
4. Inserire il nome di un esperimento
5. Selezionare un termociclatore e accertarsi che l'anello di bloccaggio sia attaccato.
6. Fare clic sul pulsante verde "Start run" (Avvia il processo).

Termine e rilascio di un processo

Per esaminare l'avanzamento del processo, passare alla corrispondente schermata del termociclatore. Quando il processo è terminato, fare clic su "Finish run" (Termina processo) per uscire dal termociclatore e convalidare il campione nell'ambiente "Approval" (Convalida).

7. Selezionare l'ambiente "Approval".
8. Fare clic su "Apply filter" (Applica filtro) (oppure scegliere prima le proprie opzioni di filtraggio).
9. Selezionare l'esperimento.
10. Fare clic su "Start approval" (Avvia convalida).
11. Convalidare i risultati di ogni campione di analisi: Usare il pulsante "Accepted" (Accettato) per i campioni di cui si approvano i risultati analizzati dal Rotor-Gene AssayManager. Usare il pulsante "Rejected" (Rifiutato) se il risultato del campione di analisi valutato dal Rotor-Gene AssayManager è inaccettabile per qualche ragione.

Nota: un risultato impostato automaticamente su "Invalid" (Non valido) dal Rotor-Gene AssayManager non può essere più convertito in un risultato valido neanche rifiutando il risultato.

12. Fare clic su "Release /report data..." (Rilascio/report dei dati...).

13. Selezionare un profilo del report e fare clic su "OK". Il report sarà generato e memorizzato automaticamente.

Nota: per convalidare un processo l'utente deve possedere diritti di convalida.

14. Scaricare il Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ed eliminare le provette per strisce nel rispetto dei regolamenti locali in materia di sicurezza.

Interpretazione dei risultati con il Rotor-Gene AssayManager

L'artus CT/NG QS-RGQ AssayProfile per campioni di urina imposta automaticamente la soglia e contiene tutte le istruzioni per interpretare automaticamente i risultati del test. Il software valuta sulla base di queste istruzioni la validità o meno dei campioni e dei controlli. Questa analisi automatica può generare i flag di seguito descritti.

IMPORTANTE: al canale NG si applica un valore soglia di 40 C_T , che genera un risultato "INVALID" (non valido) con contrassegno "CT_ABOVE_ACCEPTED_RANGE" (CT superiore all'intervallo di accettazione). Seguire attentamente le seguenti istruzioni.

- Se il valore di NG è riportato come non valido con contrassegno "CT_ABOVE_ACCEPTED_RANGE" (CT superiore all'intervallo di accettazione) e il valore di IC è rilevato e valido, il campione può essere trattato come un **campione NG-negativo valido**. Non è richiesta la ripetizione del test.
- Se il valore di NG è riportato come non valido con qualsiasi altro contrassegno, il campione deve essere testato nuovamente.
- Se il valore di CT è riportato come non valido con qualsiasi contrassegno, il campione deve essere testato nuovamente.

Flag	Comportamento	Descrizione
ASSAY_INVALID	Non valido	Il test non è valido perché almeno un controllo esterno non è valido.
CT_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Non valido	Il valore C_T rilevato è superiore al C_T cut-off definito. IMPORTANTE: se NG è riportato come non valido con questo contrassegno, il campione può essere trattato come un campione NG-negativo valido a condizione che il valore di IC sia valido.
CT_BELOW_ACCEPTED_RANGE	Non valido	Il valore C_T rilevato è inferiore al C_T cut-off definito.

Flag	Comportamento	Descrizione
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Non valido	La curva di amplificazione dei dati non elaborati mostra una forma che devia rispetto al comportamento definito per questo test. Esiste un'elevata probabilità di risultati errati o di un'errata interpretazione dei risultati.
FLAT_BUMP	Non valido	La curva di amplificazione mostra una forma simile ad una protuberanza piatta, che devia rispetto al comportamento definito per questo test. Esiste un'elevata probabilità di risultati errati o di un'errata interpretazione dei risultati (errata determinazione del valore C_T).
FLUORESCENCE_TOO_LOW	Non valido	Il segnale di fluorescenza è inferiore al valore cut-off di fluorescenza definito.
IC_INVALID	Non valido	Il controllo interno non è valido. Il target e il controllo interno condividono la stessa provetta.
IC_NO_SIGNAL	Non valido	Nessun segnale del controllo interno è stato rilevato. Il target e il controllo interno condividono la stessa provetta.
INHIBITION_BY_CT	Non valido	È stato superato il range massimo definito per il valore C_T fra il C_T per il controllo interno del campione e il C_T per il controllo interno del NTC.
INHIBITION_BY_FLUORESCENCE	Non valido	È stata superata la differenza massima di fluorescenza definita fra la fluorescenza del controllo interno del NTC e la fluorescenza del controllo interno del campione per l'ultimo ciclo.

Flag	Comportamento	Descrizione
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	Avvertenza	<p>La variazione percentuale della fluorescenza per questo campione relativamente alla provetta campione con la massima variazione della fluorescenza è inferiore a un limite definito.</p> <p>Nota: se un campione valido viene etichettato con questo flag, al convalidatore viene richiesto di prestare particolare attenzione al fatto descritto da tale flag prima di decidere se accettare o rifiutare il risultato.</p>
MULTI_THRESHOLD_CROSSING	Non valido	<p>La curva di amplificazione incrocia la soglia più di una volta. Non può essere stabilito un valore C_T univoco.</p>
NO_CT_DETECTED	Non valido	<p>Non viene rilevato alcun valore C_T per questo target.</p>
NORM_FACTOR_ALTERATION	Avvertenza	<p>Normalizzazione fallita. La curva di amplificazione viene visualizzata senza normalizzazione. La correttezza dei risultati deve essere controllata manualmente.</p>
OTHER_TARGET_INVALID	Non valido	<p>Un altro target per lo stesso campione non è valido.</p>
SATURATION	Non valido	<p>La fluorescenza dei dati non elaborati risulta notevolmente satura prima del punto di flessione della curva di amplificazione.</p>
SPIKE	Avvertenza	<p>Nella curva di amplificazione è stato rilevato un picco nella fluorescenza dei dati non elaborati, ma all'esterno della regione in cui è determinato il valore C_T.</p> <p>Nota: se un campione valido viene etichettato con questo flag, al convalidatore viene richiesto di prestare particolare attenzione al fatto descritto da tale flag prima di decidere se accettare o rifiutare il risultato.</p>

Flag	Comportamento	Descrizione
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Non valido	Nella curva di amplificazione è stato rilevato un picco vicino al valore C_T .
STEEP_BASELINE	Non valido	Nella curva di amplificazione è stato rilevato un ripido tratto ascendente nella linea di base per la fluorescenza dei dati non elaborati.
STRONG_BASELINE_DIP	Non valido	Nella curva di amplificazione è stato rilevato un ripido tratto discendente nella linea di base per la fluorescenza dei dati non elaborati.
STRONG_NOISE	Non valido	È stato rilevato un forte rumore all'esterno della fase di crescita della curva di amplificazione.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Non valido	È stato rilevato un forte rumore nella fase di crescita (esponenziale) della curva di amplificazione.
UNEXPECTED_CT_DETECTED	Non valido	È stato rilevato un valore C_T per un target che non deve essere amplificato.
UPSTREAM	Variable	<p>Lo stato dei campioni è stato impostato su "invalid" o "unclear" (equivoco) da un processo a monte (es. setup del test QIA Symphony).</p> <p>Nota: Per i flag "unclear" dei processi a monte, il comportamento del Rotor-Gene AssayManager è definito nell'ambiente "Configuration" (Configurazione).</p> <p>Per i flag "invalid" dei processi a monte, il Rotor-Gene AssayManager invalida sempre tali campioni.</p>
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Non valido	Nella curva di amplificazione è stato rilevato un tratto sinusoidale nella linea di base per la fluorescenza dei dati non elaborati.

I risultati del Rotor-Gene AssayManager devono essere approvati/rifiutati da un utente con il ruolo di "Approver" (Convalidatore). Per maggiori informazioni sul processo di convalida, consultare il manuale utente del Plug-in di Base artus del Rotor-Gene AssayManager (*Rotor-Gene AssayManager artus Basic Plug-in User Manual*).

PCR in tempo reale utilizzando il software Rotor-Gene Q 2.1 o versione superiore

Impostazioni specifiche per il kit *artus* CT/NG QS-RGQ Kit

Con il software Rotor-Gene 2.1, le impostazioni specifiche sono descritte qui di seguito.

Volume di reazione (μ L)	25
Mantenimento	Temperatura di mantenimento: 95° Durata di mantenimento: 15 minuti
Ciclizzazione	45 volte 95° per 11 s 60° per 20 s 72° per 20 s
Setup di ottimizzazione dell'auto-gain	60° (Campioni: CT: Green (verde), NG: Orange (arancione); IC: Yellow (giallo))

Per istruzioni dettagliate consultare la Scheda di Protocollo "Settings to run *artus* QS-RGQ Kits" (Impostazioni per eseguire il kit *artus* QS-RGQ) disponibile all'indirizzo www.qiagen.com/products/artusctngqsrqgkitce.

Interpretazione dei risultati utilizzando il software Rotor-Gene Q 2.1 o versione superiore

Il kit *artus* CT/NG QS-RGQ può essere eseguito sul Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrument utilizzando l'analisi manuale con il software Rotor-Gene Q 2.1 o versione superiore. Questa sezione descrive l'interpretazione dei risultati sul RotorGene Q MDx 5plex HRM instrument. Esaminare anche le informazioni sullo stato dei campioni ricavate dai file dei risultati del QIAsymphony SP/AS per l'analisi del flusso di lavoro completo dal campione al risultato. Utilizzare unicamente campioni con stato valido.

Rilevazione dei segnali e conclusioni

Segnale nel canale Cycling Green (ciclo verde)	Segnale nel canale Cycling Orange (ciclo arancione) ≤40 Cts	Segnale nel canale Cycling Orange (ciclo arancione) >40 Cts	Segnale nel canale Cycling Yellow (ciclo giallo)	Interpretazione
Sì	No	No	Sì/No*	Risultato valido: DNA di CT rilevato, DNA di NG non rilevato
Sì	No	Sì	Sì/No*	Risultato valido: DNA di CT rilevato, DNA di NG non rilevato
No	Sì	No	Sì/No*	Risultato valido: DNA di CT non rilevato, DNA di NG rilevato
Sì	Sì	No	Sì/No*	Risultato valido: DNA di CT e NG rilevato
No	No	Sì	Sì	Risultato valido: nessun DNA di CT o NG rilevato [†]
No	No	No	Sì	Risultato valido: nessun DNA di CT o NG rilevato [†]
No	No	Sì	No	Risultato non valido: non si può trarre alcun risultato [‡]
No	No	No	No	Risultato non valido: non si può trarre alcun risultato [‡]

* In questo caso, la rilevazione di un segnale nel canale Cycling Yellow è superflua, dal momento che le concentrazioni iniziali di DNA di CT (segnale positivo nei canali Cycling Green e/o Cycling Orange) possono dare origine a un segnale di fluorescenza ridotto o assente del controllo interno nel canale Cycling Yellow (concorrenza).

† Se il valore C_T per il controllo interno di un campione negativo è superiore di 5 cicli al valore C_T per il controllo interno del controllo no template nel processo ($C_{T\ IC\ Campione} - C_{T\ IC\ NTC} > 5$), il campione va considerato inibito. Non si può trarre alcun risultato.

‡ Si possono trovare informazioni sulle cause d'errore e relative soluzioni nella "Guida alla risoluzione dei problemi" del Manuale del kit *artus CT/NG QS-RGQ* (*artus CT/NG QS-RGQ Kit Handbook*).

Impostazione della soglia per l'analisi PCR

La seguente tabella riporta le impostazioni della soglia consigliate per il test *artus CT/NG*.

Impostazioni della soglia consigliate

Canale di fluorescenza	Impostazione della soglia
Cycling Green	0,07
Cycling Orange	0,10
Cycling Yellow	0,03

Esempi di reazioni PCR positive e negative

Il kit *artus* CT/NG QS-RGQ contiene 2 controlli per monitorare la procedura di estrazione e la PCR: il controllo CT/NG CT+/NG- e il controllo CT/NG NG+/CT-. Questi controlli vengono caricati sugli strumenti QIAasymphony SP/AS e trattati come gli altri campioni. Il controllo interno (CT/NG RG IC) viene aggiunto al campione durante il processo di estrazione del DNA ed è presente in tutti i campioni e l'NTC.

I controlli sono utilizzati nel processo di preparazione della PCR e devono produrre risultati specifici nella PCR, simili a quelli illustrati nelle figure sottostanti.

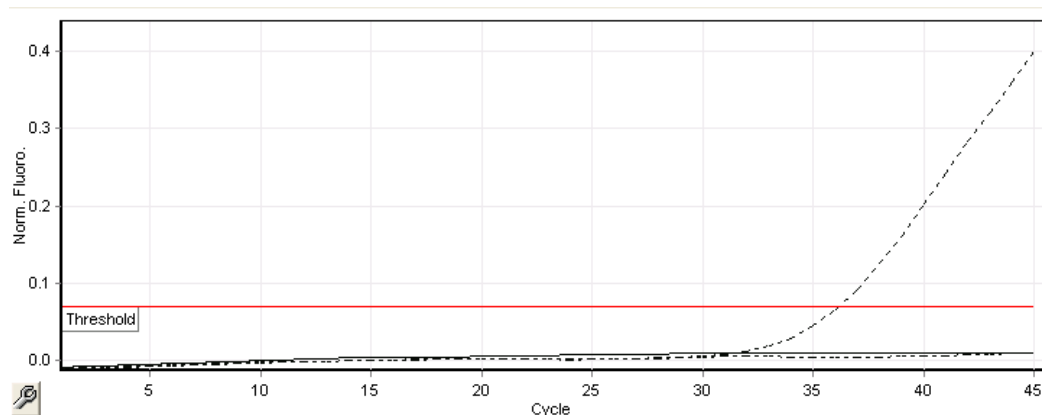


Figura 1. Cycling Green: Controllo positivo per CT. Risultati di un'analisi con il controllo CT/NG CT+/NG-.

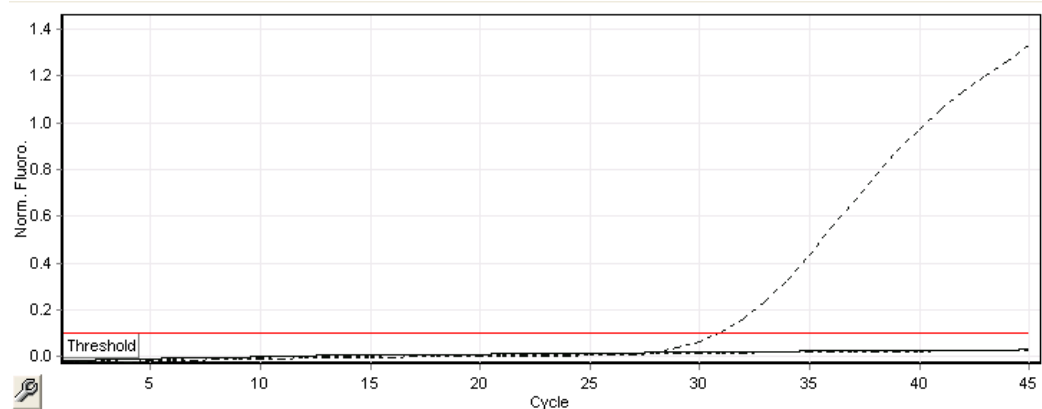


Figura 2. Cycling Orange: Controllo positivo per NG. Risultati di un'analisi con il controllo CT/NG NG+/CT-.

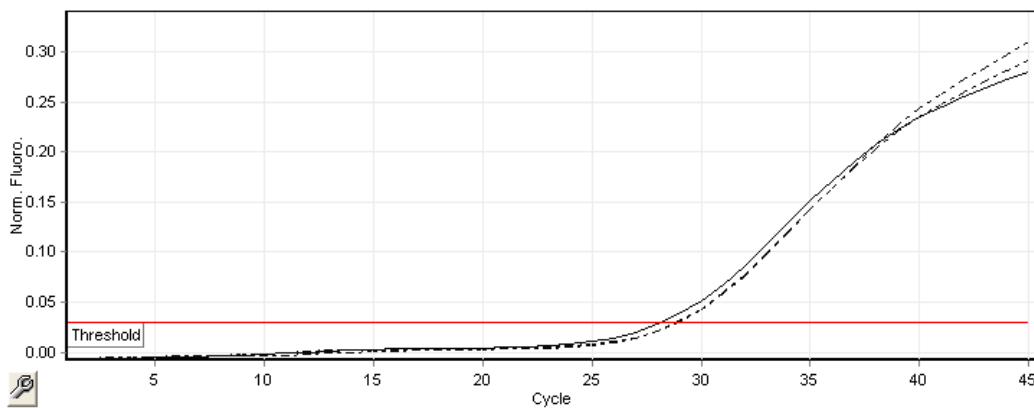


Figura 3. Cycling Yellow: controllo interno. Risultati di un'analisi con il controllo interno CT/NG RG IC.

I valori C_T attesi per i controlli per un'analisi PCR valida ed efficace sono riportati nella tabella seguente.

Valori C_T attesi

Controllo/campione	Range C_T (minimo – massimo)		
	Cycling Green	Cycling Yellow	Cycling Orange
Controllo CT+/NG-	28,99-37,94	$\leq 33,44$	-
Controllo NG+/CT-	-	$\leq 33,44$	27,22-35,08
NTC	-	$\leq 33,44$	-
Campione paziente	Qualsiasi	\leq valore C_T del NTC nell'analisi corrente + 5 C_T	Qualsiasi

In caso di errore ad uno dei controlli o al corrispondente segnale IC, l'analisi deve essere considerata non valida.

Limiti della metodica

È stato condotto uno studio per valutare le prestazioni del kit *artus* CT/NG QS-RGQ con campioni contenenti elevate concentrazioni di CT o NG in presenza dell'altro patogeno in ridotti numeri di copie. I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Prestazioni del kit *artus* CT/NG QS-RGQ con diverse concentrazioni di DNA bersaglio

Patogeno A	Patogeno B	Percentuale di successo patogeno B (%)
$1,00 \times 10^6$ cfu/ml <i>N. gonorrhoeae</i>	23 EB/ml <i>C. trachomatis</i>	100
$1,00 \times 10^5$ EB/ml <i>C. trachomatis</i>	58,5 cfu/ml <i>N. gonorrhoeae</i>	100

Nota: Concentrazioni inferiori del "patogeno B" possono causare tassi di successo inferiori.

Per le informazioni aggiornate sulla licenza e le clausole di esclusione della responsabilità per i singoli prodotti, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN specifico. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza QIAGEN o al distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, QIAasymphony®, *artus*®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Group); BD™ (Becton, Dickinson and Company); eNaT™ (Copan Italia Spa).

Contratto di Licenza Limitato per *artus* CT/NG QS-RGQ

Use of this product signifies the agreement of any purchaser or user of the product to the following terms:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al relativo manuale e soltanto con i componenti contenuti nel rispettivo Kit. QIAGEN non concede alcuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo kit con qualsiasi componente non incluso in questo kit, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre alcuna garanzia in merito a essi né alla violazione da parte di essi di eventuali diritti di terzi.
2. A parte le licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce alcuna garanzia che questo kit e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscono violazione dei diritti di terzi.
3. Questo kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per un solo utilizzo e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN potrà far valere i divieti di cui al presente Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutti i costi sostenuti a scopo di indagine e delle spese di giudizio, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare il presente Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo kit e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, visitare il sito www.qiagen.com.

Acquistando il presente prodotto si acquisisce il diritto all'uso dello stesso per lo svolgimento di servizi diagnostici nell'ambito della diagnostica umana in vitro. L'acquisto non costituisce concessione di licenze generali o di altre licenze di alcun altro tipo, salvo questo specifico diritto all'uso.

HB-1517-S02-003 07-2017

© 2017 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

