

# Scheda di applicazione QIASymphony® RGQ

## Applicazione QIASymphony RGQ Kit *artus*® HI Virus-1 QS-RGQ (tipo campione: plasma)

IVD

CE  
0197



Prima di eseguire il test, verificare la disponibilità delle nuove revisioni delle etichette elettroniche in [www.qiagen.com/products/artushivusrtpcrkitce.aspx](http://www.qiagen.com/products/artushivusrtpcrkitce.aspx). Lo stato corrente della revisione è indicato dalla data di emissione (formato: mese/anno).

### Informazioni generali

Kit	<i>artus</i> HI Virus-1 QS-RGQ Kit, versione 1, <b>REF</b> 4513363, 4513366
Materiale campione convalidato	Plasma umano trattato con EDTA
Purificazione front-end	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (cat. n° 937055)
Volume del campione (incl. volume in eccesso)	1.200 µl
Set di parametri del test	<i>artus</i> _HIV plasma1000_V4
Set di controllo del test predefinito	Cellfree1000_V6 _DSP <i>artus</i> HIV
Volume di eluizione	60 µl
Versione del software necessaria	Versione 4.0 o superiore
Volume miscela master	30 µl
Volume stampo	20 µl
Numero di reazioni	6–24 o 6–72*
Durata esecuzione su modulo AS	Per 6 reazioni: circa 9 minuti Per 72 reazioni: circa 35 minuti

\*Durante l'elaborazione di analisi multiple, accertarsi di non superare il limite di 72 reazioni e 1 adattatore per ogni rack per test. Evitare tempi di incubazione lunghi (>30 minuti) tra il completamento dell'analisi e il trasferimento allo strumento Rotor-Gene® Q.

**Maggio 2012**



Sample & Assay Technologies

## Materiali necessari ma non in dotazione

Kit di purificazione	■	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (cat. n° 937055)
Adattatori per QIASymphony SP	■	Elution Microtube Rack QS (Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym) (rack QS per microprovette di eluizione (adattatore di raffreddamento, EMT, v2, Qsym), cat. n° 9020730)
	■	Tube Insert 3B (Insert, 2.0ml v2, samplecarr. (24), Qsym) (inserto provetta 3B (inserto, 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 H (microprovette da 2,0 ml tipo H) o Micro tubes 2.0 ml Type I (microprovette da 2,0 ml tipo I) (Sarstedt, cat. n° 72.693 e 72.694, <a href="http://www.sarstedt.com">www.sarstedt.com</a> ) da usare con campioni e controlli interni
Adattatori e portareagenti per QIASymphony AS	■	Reagent holder 1 QS (Cooling Adapter, Reagent Holder 1, Qsym) (portareagente 1 QS (adattatore raffreddamento, portareagente 1, Qsym), cat. n° 9018090)
	■	Reagent holder 2 QS (Cooling Adapter, Reagent Holder 2, Qsym) (portareagente 2 QS (adattatore raffreddamento, portareagente 2, Qsym), cat. n° 9018089)
	■	RG Strip Tubes 72 QS (Cooling Adapter, RG Strip Tubes 72, Qsym) (provette per strisce RG 72 QS (adattatore 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 coniche, 2 ml, Qsym AS) (cat. n° 997102)* o Micro tubes 2.0 ml Type I (microprovette da 2,0 ml tipo I) (Sarstedt, cat. n° 72.694.005)
	■	Tubes, conical, 5 ml, Qsym AS (provette coniche, 5 ml, Qsym AS) (cat. n° 997104)* o Tubes with flat base from PP (provette a base piatta da PP) (Sarstedt, cat. n° 60.558.001)
	■	Reagent Bottles (flaconi reagente), 30 ml, Qsym AS (cat. n° 997108)
	■	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)

\* Consigliamo di informarsi sulla disponibilità.

---

## Conservazione e manipolazione dei campioni

Raccolta dei campioni	Campione di sangue 5–10 ml di sangue trattato con EDTA Miscelare capovolgendo per 8 volte — non agitare! Non utilizzare campioni umani eparinizzati
Conservazione dei campioni	Separazione: 20 minuti di centrifugazione, 800–1.600 x g entro 24 ore dal prelievo Trasferimento del plasma isolato in una provetta sterile in polipropilene RNA incapsulato nel virus stabile a:* 4°C    giorni –20°C   settimane –70°C   mesi
Trasporto dei campioni	Trasporto in contenitore infrangibile Spedizione entro 24 ore Spedizione per posta secondo le norme legali per il trasporto di materiali patogeni† I campioni di sangue vanno spediti refrigerati (2–8°C).
Sostanze interferenti	L'eparina ( $\geq 10$ UI/ml) influisce sulla PCR. Non utilizzare campioni raccolti in provette contenenti eparina come anticoagulante o campioni ottenuti da pazienti eparinizzati. Il sistema non è influenzato dai livelli elevati di albumina ( $\leq 6$ g/dl), bilirubina ( $\leq 30$ mg/dl), lipidi ( $\leq 1$ g/dl trigliceridi) e campioni emolitici ( $\leq 2$ g/dl emoglobina).

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

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

## Procedura

### Preparazione di carrier RNA e aggiunta del controllo interno ai campioni

L'utilizzo del kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi in combinazione con il kit *artus* HI Virus-1 QS-RGQ richiede l'aggiunta del controllo interno (HI Virus-1 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  $\mu$ l.

La tabella rappresenta l'aggiunta di controllo interno all'isolamento in ragione di 0,1  $\mu$ l per 1  $\mu$ l di volume di eluizione. Si consiglia di preparare miscele fresche per ogni analisi subito prima dell'uso.

Componente	Volume ( $\mu$ l) (provette Sarstedt®)*	Volume ( $\mu$ l) (provette BD™)†
Soluzione madre con carrier RNA (CARRIER)	5	5
Controllo interno‡	9	9
Tampone AVE	106	106
<b>Volume finale per campione (volume morto escluso)</b>	<b>120</b>	<b>120</b>
<b>Volume totale per n campioni</b>	<b>(n x 120) + 360§</b>	<b>(n x 120) + 600¶</b>

\* Microprovette da 2,0 ml tipo H o microprovette da 2,0 ml tipo I, Sarstedt, cat. n° 72.693 e 72.694.

† 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  $\mu$ l). Il volume addizionale a vuoto dipende dal tipo di provetta per campione utilizzata.

§ La miscela di controllo interno richiesta corrisponde a 3 campioni supplementari (ossia, 360  $\mu$ l). Non riempire con oltre 1,92 ml di volume totale (corrispondente a un massimo di 13 campioni). Questi volumi sono specifici delle microprovette da 2,0 ml tipo H e delle microprovette da 2,0 ml tipo I, Sarstedt cat. n° 72.693 e 72.694).

¶ La miscela di controllo interno richiesta corrisponde a 5 campioni supplementari (ossia, 600  $\mu$ l). Non riempire con oltre 13,92 ml di volume totale (corrispondente a un massimo di 111 campioni). Questi volumi sono specifici per provette da 14 ml, 17 x 100 mm in polistirene a fondo tondo, Becton Dickinson, cat. n° 352051).

## Preparazione del QIASymphony SP

### Cassetto "Waste" (materiali di scarto)

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

### Cassetto "Eluate" (eluito)

<b>Rack per eluizione</b>	Si raccomanda di utilizzare l'apertura 1, posizione di raffreddamento
<b>Volume di eluizione*</b>	Volume di eluizione preselezionato: 60 $\mu$ l Volume di eluizione iniziale: 90 $\mu$ l

\* 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)

<b>RC posizioni 1 e 2</b>	Caricare 1 cartuccia reagenti (RC) per max. 48 campioni o 2 cartucce reagenti nuove (RC) per max. 96 campioni
<b>Supporto rack puntali posizioni 1-4</b>	Caricare un sufficiente numero di rack per puntali con filtro monouso, 200 $\mu$ l (vedere "Plastica da laboratorio necessaria per lotti a 1-4 campioni", pag. 6)
<b>Supporto rack puntali posizioni 5-18</b>	Caricare un sufficiente numero di rack per puntali con filtro monouso, 1.500 $\mu$ l (vedere "Plastica da laboratorio necessaria per lotti a 1-4 campioni", pag. 6)
<b>Supporto per box unitari posizioni 1-3</b>	Caricare 3 box unitari contenenti le cartucce per preparazione campioni
<b>Supporto per box unitari posizione 4</b>	Caricare 1 box unitario contenente i coperchi per 8 barre

## Cassetto "Sample" (campione)

<b>Tipo di campione</b>	Plasma
<b>Volume del campione (compreso il volume in eccesso)</b>	1.200 $\mu$ l
<b>Provette per campioni</b>	Microprovette da 2,0 ml tipo H o microprovette da 2,0 ml tipo I (Sarstedt, cat. n° 72.693 e 72.694)
<b>Inserto</b>	Inserto provetta 3B (cat. n° 9242083)

## Plastica da laboratorio necessaria per lotti a 1–4 campioni

	<b>Un lotto, 24 campioni<sup>†</sup></b>	<b>Due lotti, 48 campioni<sup>†</sup></b>	<b>Tre lotti, 72 campioni<sup>†</sup></b>	<b>Quattro lotti, 96 campioni<sup>†</sup></b>
<b>Puntali con filtro monouso, 200 <math>\mu</math>l<sup>‡§</sup></b>	28	52	76	100
<b>Puntali con filtro monouso, 1.500 <math>\mu</math>l<sup>‡§</sup></b>	113	206	309	402
<b>Cartucce per la preparazione dei campioni<sup>¶</sup></b>	21	42	54	72
<b>Coperchi per 8 barre<sup>**</sup></b>	3	6	9	12

<sup>†</sup> L'impiego di più di una provetta di controllo interno per lotto e l'esecuzione di più scansioni di inventario richiedono ulteriori puntali con filtro monouso.

<sup>‡</sup> Ci sono 32 puntali con filtro in ogni rack per puntali.

<sup>§</sup> La quantità di puntali con filtro necessari include i puntali con filtro per 1 scansione di inventario per ogni cartuccia reagenti.

<sup>¶</sup> Ci sono 28 cartucce per la preparazione dei campioni in ogni box unitario.

<sup>\*\*</sup> Ci sono dodici coperchi per 8 barre in ogni box unitario.

# Preparazione del QIASymphony AS

## Materiali di consumo

Durante la fase di preparazione, le corrette 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/portareagente
Provette per strisce e tappi, 0,1 ml (250)	QIA#981103 *StripTubes 0.1	Provette per strisce RG 72 QS
Provette, coniche, 2 ml, Qsym AS (500)*†	QIA#997102 *T2.0 ScrewSkirt‡	Portareagente 1 QS Portareagente 2 QS
Provette, coniche, 5 ml, Qsym AS (500)*†	QIA#997104 *T5.0 ScrewSkirt‡	Portareagente 1 QS Portareagente 2 QS
Flaconi reagente, 30 ml, Qsym AS (50)*	QIA#997108 *Bottle 30ml‡	Portareagente 2 QS
Microprovette di eluizione CL (24 x 96)	QIA#19588 * EMTR	Rack QS per microprovette di eluizione

\* Per componenti della miscela master, miscela master preparata dal sistema, standard del test e controlli del test.

† In alternativa, si possono usare le provette Sarstedt descritte in "Materiali necessari ma non in dotazione", pag. 2.

‡ 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 richiesto <sup>§</sup>
Rack per campioni	Rack QS per microprovette di eluizione	1
Portareagenti	Portareagente 1 QS	1
Rack per test	Provette per strisce RG 72 QS	1

<sup>§</sup> Calcolato per un'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).

Materiali di consumo	Nome sul touch screen	Numero minimo per 24 reazioni	Numero minimo per 72 reazioni
Puntali con filtro, 1.500 $\mu$ l (1024)	1.500 $\mu$ l	5	6
Puntali con filtro, 200 $\mu$ l (1024)	200 $\mu$ l	10	10
Puntali con filtro, 50 $\mu$ l (1024)	50 $\mu$ l	25	73
Sacchetti per smaltimento puntali	–	1	1

## RT-PCR sul Rotor-Gene Q

Fare riferimento alla scheda del protocollo specifica del software "Settings to run *artus* QS-RGQ Kits" (Impostazioni per eseguire i kit *artus* QS-RGQ) nel sito [www.qiagen.com/products/artushivirusrf-pcrkitce.aspx](http://www.qiagen.com/products/artushivirusrf-pcrkitce.aspx).

### Impostazioni specifiche per il kit *artus* HI Virus-1 QS-RGQ

Il Rotor-Gene AssayManager imposta automaticamente i parametri per il kit *artus* HI Virus-1 QS-RGQ.

Le impostazioni specifiche eseguite con il software Rotor-Gene 2.1 sono riportate di seguito.



<b>Volume di reazione (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	50
<b>Mantenimento</b>	Temperatura mantenimento: 50°C Durata mantenimento: 30 minuti
<b>Mantenimento 2</b>	Temperatura mantenimento: 95°C Durata mantenimento: 15 minuti
<b>Ciclizzazione</b>	50 volte 95°C per 30 secondi 50°C per 60 secondi 72°C per 30 secondi
<b>Setup ottimizzazione auto-gain</b>	50°C (Campioni: verdi; IC: arancione)

## Interpretazione dei risultati

La presente sezione illustra l'interpretazione dei risultati sul Rotor-Gene Q. Riesaminare anche le informazioni sullo stato dei campioni ricavate dai file dei risultati di QIASymphony SP/AS per l'analisi del flusso di lavoro completo dal campione al risultato. Utilizzare unicamente campioni con stato valido.

Il Rotor-Gene AssayManager interpreta automaticamente i risultati della PCR e fornisce una conclusione e un risultato quantitativo.

Le seguenti sezioni descrivono l'interpretazione dei risultati utilizzando il software Rotor-Gene 2.1 o superiore.

## Rilevazione del segnale e conclusioni

Segnale nel canale Cycling Green (ciclo verde)	Segnale nel canale Cycling Orange (ciclo arancione)	Risultato quantitativo (UI/ml)	Interpretazione
Sì	Sì	<76,4	Risultato valido: RNA HIV-1 rilevato, < 100 UI/ml Quantificazione non possibile poiché il risultato quantitativo è inferiore al limite di rilevazione. La riproducibilità del risultato positivo non è garantita.
Sì	Sì	≥76,4 e <100	Risultato valido: RNA HIV-1 rilevato, < 100 UI/ml Quantificazione non possibile poiché il risultato quantitativo è inferiore all'intervallo lineare del test.
Sì	Sì	≥ 100 e ≤1,00 x 10 <sup>8</sup>	Risultato valido: RNA HIV-1 rilevato alla concentrazione calcolata Il risultato quantitativo è compreso entro l'intervallo lineare del test.
Sì	Sì	>1,00 x 10 <sup>8</sup>	Risultato valido: RNA HIV-1 rilevato, > 1,00 x 10 <sup>8</sup> Quantificazione non possibile poiché il risultato quantitativo è superiore all'intervallo lineare del test.*
No	Sì	–	Risultato valido: Nessun RNA HIV-1 rilevabile.†
No	No	–	Risultato non valido: Non si può trarre alcun risultato.‡

\* Se si desidera eseguire la quantificazione, diluire il campione con plasma privo di HIV e riprocessare. Moltiplicare il risultato quantitativo ottenuto dal campione riprocessato per il fattore di diluizione.

† Se il valore  $C_T$  per il controllo interno di un campione negativo è superiore di 3 cicli al valore  $C_T$  per il controllo interno del controllo no template nell'analisi ( $C_{T\ IC\ campione} - C_{T\ IC\ NTC} > 3$ ), il campione va considerato come non valido. Non si può trarre alcun risultato.

‡ Per informazioni sulle cause d'errore e relative soluzioni, consultare la "Guida alla risoluzione dei problemi" del Manuale del kit artus HI Virus-1 QS-RGQ.

---

## Impostazione della soglia per l'analisi PCR

Le impostazioni ottimali di soglia per una data combinazione dello strumento Rotor-Gene Q e del kit *artus* QS-RGQ devono essere stabilite empiricamente provando ciascuna singola combinazione, dato che si tratta di un valore relativo che dipende dal flusso di lavoro diagnostico generale. Si può fissare la soglia ad un valore preliminare di 0,04 per la prima analisi della PCR, ma questo valore deve essere affinato in un'analisi comparativa dei successivi processi del flusso di lavoro. La soglia deve essere impostata manualmente appena sopra il segnale di fondo dei controlli negativi e dei campioni negativi. Il valore medio di soglia calcolato da questi esperimenti funzionerà molto probabilmente per la maggioranza dei processi futuri, ma l'utilizzatore dovrà ugualmente rivedere il valore di soglia prodotto ad intervalli regolari. Il valore di soglia sarà normalmente compreso nell'intervallo 0,03–0,05 e dovrà essere arrotondato a non più di tre cifre decimali.

## Quantificazione

Gli standard di quantificazione (HI Virus-1 RG QS 1–4) nel kit *artus* HI Virus-1 QS-RGQ sono trattati come campioni precedentemente purificati e si utilizza lo stesso volume (20 µl). Per generare una curva standard sugli strumenti Rotor-Gene Q, tutti i 4 standard di quantificazione devono essere utilizzati e definiti nella finestra di dialogo "Edit Samples" (modifica campioni) dello strumento Rotor-Gene Q come standard con le concentrazioni specificate (vedere manuale utente dello strumento).

**Nota:** Gli standard di quantificazione sono definiti come UI/µl.\* Si deve applicare la seguente equazione per convertire i valori, determinati mediante la curva standard, in UI/ml di materiale campione

$$\text{Risultato (UI/ml)} = \frac{\text{Risultato (UI/}\mu\text{l)} \times \text{volume di eluizione iniziale (90 }\mu\text{l)}^\dagger}{\text{Volume campione (ml)}}$$

In linea di principio, si deve inserire nell'equazione di cui sopra il volume iniziale del campione. Occorre tenerne conto quando il volume del campione è stato modificato prima dell'estrazione dell'acido nucleico (ad es. riducendo il volume mediante centrifugazione o aumentandolo mediante aggiunta al volume richiesto per l'isolamento).

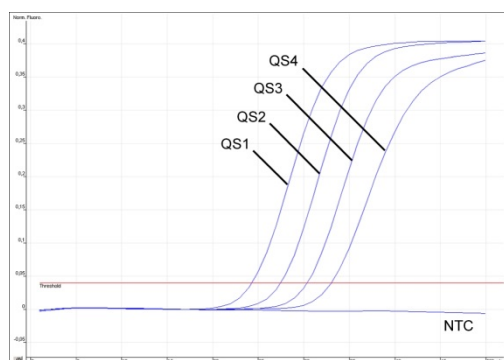
## Fattore di conversione

1 UI/ml corrisponde a 0,45 copie/ml per la rilevazione dell'RNA HIV-1 sul Rotor-Gene Q. Il fattore di conversione è stato stabilito mediante analisi di regressione di serie multiple di diluizione, rispetto a un metodo di riferimento in copie/ml.

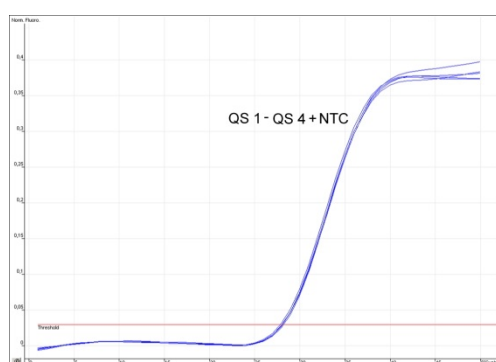
\* Lo standard è stato calibrato applicando lo Standard Internazionale HIV (OMS).

† Il calcolo è basato sui volumi di eluizione iniziali (90 µl).

## Esempi di reazioni PCR positive e negative



Rilevazione degli standard di quantificazione (HI Virus-1 RG QS 1–4) nel canale di fluorescenza Cycling Green. NTC: controllo no template (controllo negativo).



Rilevazione del controllo interno (IC) nel canale di fluorescenza Cycling Orange con amplificazione contemporanea degli standard di quantificazione (HI Virus-1 RG QS 1–4). NTC: controllo no template (controllo negativo).

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti consultare il manuale del kit QIAGEN specifico. I libretti delle istruzioni e i manuali utente dei kit QIAGEN sono disponibili all'indirizzo [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al proprio distributore locale.

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

© 2012 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

[www.qiagen.com](http://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