

Ficha de Aplicação do QIA Symphony® RGQ

Aplicação do QIA Symphony RGQ Kit *artus*® BK Virus QS-RGQ (tipo de amostra: urina, 400 µl)



Antes da execução do teste, verifique a disponibilidade de novas revisões de classificação eletrônica em www.qiagen.com/products/artusbkvirusrgqprkit.aspx. O estado atual da revisão é indicado pela data de publicação (formato: mês/ano).

Informações gerais

Kit	Kit <i>artus</i> BK Virus QS-RGQ, Versão 1	REF 4514363
Material de amostra validado	Urina	
Purificação primária	Midi Kit QIA Symphony DSP Virus/Pathogen (Ref.º 937055)	
Volume da amostra (incluindo o volume excedente)	500 µl	
Conjunto de parâmetros do ensaio	artus_BKV_urine400_V4	
Conjunto padrão de controle de teste	Complex400_V4_DSP_artus_BKV	
Volume de eluição	60 µl	
Versão de software necessária	Versão 4.0 ou superior	
Volume da mistura Master	10 µl	
Volume do modelo	15 µl	
Número de reações	6–24*	
Tempo de execução no módulo AS	Para 6 reações: aproximadamente 8 minutos Para 72 reações: aproximadamente 35 minutos	

* Para a configuração do ensaio do vírus BK, podem ser configurados até 216 (9 X 24) ensaios em um único ensaio no QIA Symphony AS.



Maio 2012

Sample & Assay Technologies

Materiais necessários mas não fornecidos

Kit de purificação	■ QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (Midi Kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen) (Ref.º 937055)
Adaptadores para o QIASymphony SP	■ Elution Microtube Rack QS (Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym (rack de microtubos de eluição QS (Adaptador de resfriamento, EMT, v2, Qsym, Ref.º 9020730)) ■ Tube Insert 3B (introdutor de tubo 3B) (Introdutor, 2,0 ml v2, samplecarr. (24), Qsym, Ref.º 9242083)
Produtos consumíveis para o QIASymphony SP	■ Sample Prep Cartridges, 8-well (cartuchos de preparo de amostras, 8 poços) (Ref.º 997002) ■ 8-Rod Covers (tampas de 8 hastes) (Ref.º 997004) ■ Filter-Tips, 1500 µl (ponteiras com filtro, 1500 µl) (Ref.º 997024) ■ Filter-Tips, 200 µl (ponteiras com filtro, 200 µl) (Ref.º 990332) ■ Elution Microtubes CL (microtubos de eluição CL) (Ref.º 19588) ■ Tip disposal bags (sacos de descarte de ponteiras) (Ref.º 9013395) ■ Micro tubes 2.0 ml Type H or Micro tubes 2.0 ml Type I (microtubos 2,0 ml tipo H ou microtubos 2,0 ml tipo I) (Sarstedt, Ref.ºs 72.693 e 72.694, www.sarstedt.com), para uso com amostras e controles internos
Adaptadores e suportes de reagentes para o QIASymphony AS	■ Reagent holder 1 QS (Cooling Adapter, Reagent Holder 1, Qsym (suporte de reagentes 1 QS (Adaptador de resfriamento, Suporte de reagentes 1, Qsym, Ref.º 9018090)) ■ Reagent holder 2 QS (Cooling Adapter, Reagent Holder 2, Qsym (suporte de reagentes 2 QS (Adaptador de resfriamento, Suporte de reagentes 2, Qsym, Ref.º 9018089)) ■ RG Strip Tubes 72 QS (Cooling Adapter, RG Strip Tubes 72, Qsym (tubos em tiras RG 72 QS (Adaptador de resfriamento, Tubos em tiras RG 72, Qsym, Ref.º 9018092))
Produtos consumíveis para o QIASymphony AS	■ Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (tubos em tiras e tampas, 0,1 ml) (Ref.º 981103) ■ Tubes, conical, 2 ml, Qsym AS (tubos, cônicos, 2,0 ml, Qsym AS) (Ref.º 997102)* ou Micro tubes 2.0 ml Type I (microtubos 2,0 ml tipo I) (Sarstedt, Ref.º 72.694.005) ■ Tube, conical, 5 ml, Qsym AS (tubo, cônico, 5,0 ml, Qsym

	AS) (Ref.º 997104)* ou Tubes with flat base from PP (tubos de base chata de PP) (Sarstedt, Ref.º 60.558.001)
	■ Reagent Bottles, 30 ml, Qsym AS (Fracos de reagentes, 30 ml, Qsym AS) (Ref.º 997108)
	■ Elution Microtubes CL (microtubos de eluição CL) (Ref.º 19588)
	■ Filter-Tips, 1500 µl (ponteiras com filtro, 1500 µl) (Ref.º 997024)
	■ Filter-Tips, 200 µl (ponteiras com filtro, 200 µl) (Ref.º 990332)
	■ Filter-Tips, 50 µl (ponteiras com filtro, 50 µl) (Ref.º 997120)
	■ Tip disposal bags (sacos de descarte de ponteiras) (Ref.º 9013395)
Para preparação da amostra (urina)	■ Buffer ATL, GPR (Tampão ATL) (Ref.º 939016)

* Pergunte sobre a disponibilidade.

Armazenamento e manuseio de amostras

Coleta de amostras	Urina humana
Transporte das amostras	Transporte resistente a quebras Envio dentro de 6 horas Envio por correio de acordo com as instruções legais para o transporte de material patogênico*
Preparação das amostras	Evite a formação de espuma nas amostras ou sobre elas. As amostras devem ser equilibradas à temperatura ambiente (15–25 °C) antes de iniciar a operação.

* Associação Internacional de Transporte Aéreo (International Air Transport Association, IATA). Regulamentos para mercadorias perigosas.

Procedimento

Preparação do RNA transportador e adição do controle interno às amostras

O uso dos Midi Kit QIAasymphony DSP Virus/Pathogen em combinação com o Kit *artus* BK Virus QS-RGQ exige a introdução do controle interno (BK Virus RG IC) no procedimento de purificação para monitorar a eficiência da preparação da amostra e do ensaio posterior.

Os controles internos devem ser adicionados com a mistura de RNA transportador (CARRIER) e Tampão AVE (AVE), e o volume total da mistura de controle interno, RNA transportador (CARRIER) e Tampão AVE (AVE) continua sendo 120 μ l.

A tabela representa a adição do controle interno ao isolado em uma proporção de 0,1 μ l por 1 μ l de volume de eluição. É recomendável preparar misturas frescas para cada ensaio logo antes de sua utilização.

Componente	Volume (μ l) (tubos Sarstedt®)*	Volume (μ l) (tubos BD™)†
RNA transportador (CARRIER) concentrado	3	3
Controle interno‡	9	9
Tampão AVE	108	108
Volume final por amostra (excluindo o volume morto)	120	120
Volume total para n amostras	(n x 120) + 360§	(n x 120) + 600¶

* Microtubos 2,0 ml tipo H e microtubos 2,0 ml tipo I, Sarstedt, Ref.^{as} 72.693 e 72.694.

† Tubos 14 ml, 17 x 100 mm, poliestireno, fundo redondo (Becton Dickinson, Ref.º 352051).

‡ O cálculo da quantidade de controle interno baseia-se nos volumes iniciais de eluição (90 μ l). O volume morto adicional depende do tipo de tubo de amostra usado.

§ É necessária uma mistura de controle interno correspondente a 3 amostras adicionais (ou seja, 360 μ l). Não ultrapasse o volume total de 1,92 ml (correspondente ao máximo de 13 amostras). Esses volumes são específicos para microtubos de 2,0 ml, tipo H, e microtubos de 2,0 ml, tipo I, Sarstedt, Ref.^{as} 72.693 e 72.694).

¶ É necessária uma mistura de controle interno correspondente a 5 amostras adicionais (ou seja, 600 μ l). Não ultrapasse o volume total de 13,92 ml (correspondente ao máximo de 111 amostras). Esses volumes são específicos para tubos de 14 ml, 17 x 100 mm, de poliestireno e fundo redondo (Becton Dickinson, Ref.º 352051).

Configuração do QIASymphony SP

Gaveta "Waste" (Resíduos)

Suporte de caixa unitária, 1–4	Caixas unitárias vazias
Suporte de saco de resíduos	Saco de resíduos
Suporte de recipiente de resíduos líquidos	Esvaziar e instalar o recipiente de resíduos líquidos

Gaveta "Eluate" (Eluído)

Rack de eluição	Usar o compartimento 1, posição de resfriamento
Volume de eluição*	Volume de eluição selecionado previamente: 60 μ l Volume de eluição inicial: 90 μ l

* O volume de eluição é selecionado previamente para o protocolo. Esse é o volume mínimo acessível 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 selecionado previamente.

Gaveta "Reagents and Consumables" (Reagentes e materiais de consumo)

Posição A1 e/ou A2	Carregue 1 cartucho de reagentes (reagent cartridge, RC) para até 48 amostras ou 2 novos cartuchos de reagentes (RC) para até 96 amostras
Posição B1	Tampão ATL (ATL)
Posições dos suportes de rack para ponteiras, 1–17	Carregue racks de ponteiras com filtro descartáveis suficientes, 200 μ l e 1.500 μ l (consulte "Artigos de plástico necessários para 1 a 4 lotes de amostra", na página 7)
Posição do suporte de caixa unitária, 1–4	Carregue as caixas unitárias com cartuchos de preparo de amostra e as tampas de 8 hastes (consulte "Artigos de plástico necessários para 1 a 4 lotes de amostra", na página 7)

Gaveta "Sample" (Amostra)

Tipo de amostra	Urina
Volume da amostra (incluindo o volume excedente)	500 μ l
Tubos de amostra	Microtubos 2,0 ml tipo H ou microtubos 2,0 ml tipo I (Sarstedt, Ref. ^{os} 72.693 e 72.694)
Introdutor	Introdutor do tubo 3B (Ref. ^o 9242083)

Artigos de plástico necessários para 1 a 4 lotes de amostra

	Um lote, 24 amostras*	Dois lotes, 48 amostras*	Três lotes, 72 amostras*	Quatro lotes, 96 amostras*
Ponteiras com filtro descartáveis, 200 μl^{†‡}	34	60	86	112
Ponteiras com filtro descartáveis, 1500 μl^{†‡}	123	205	295	385
Cartuchos de preparo de amostra[§]	18	36	54	72
Tampas de 8 hastes[¶]	3	6	9	12

* O uso de mais de um tubo de controle interno por lote e a execução de mais de uma verificação de inventário exige ponteiras com filtro descartáveis adicionais.

† Há 32 ponteiras com filtro por rack para ponteiras.

‡ O número necessário de ponteiras com filtro inclui as ponteiras com filtro para 1 verificação de inventário por cartucho de reagentes.

§ Há 28 cartuchos de preparo de amostra por caixa unitária.

¶ Há doze tampas de 8 hastes por caixa unitária.

Configuração do QIASymphony AS

Produtos consumíveis

Durante a configuração, as posições adequadas de cada produto consumível no módulo QIASymphony AS são indicadas na tela sensível ao toque do instrumento.

Produtos consumíveis	Nome na tela sensível ao toque	Para uso com adaptador/ suporte de reagentes
Tubos em fitas e tampas, 0,1 ml (250)	QIA#981103 * StripTubes 0.1	Tubos em fitas RG 72 QS
Tubos, cônicos, 2 ml, Qsym AS (500)*†	QIA#997102 *T2.0 ScrewSkirt‡	Suporte de reagentes 1 QS Suporte de reagentes 2 QS
Tubo, cônico, 5 ml, Qsym AS (500)*†	QIA#997104 *T5.0 ScrewSkirt‡	Suporte de reagentes 1 QS Suporte de reagentes 2 QS
Frascos de reagentes, 30 ml, Qsym AS (50)*	QIA#997108 * Bottle 30ml‡	Suporte de reagentes 2 QS
Microtubos de eluição CL (24 x 96)	QIA#19588 * EMTR	Rack de microtubos de eluição QS

* Para componentes da mistura master, mistura master preparada pelo sistema, padrões do ensaio e controles do ensaio.

† Como alternativa, podem ser usados os tubos Sarstedt descritos em "Materiais necessários mas não fornecidos", na página 2.

‡ O sufixo "(m)" na tela sensível ao toque indica que os cálculos de nível de líquido do tubo correspondente foram otimizados para reagentes que formam um menisco côncavo.

Adaptadores e suportes de reagentes

Rack/suporte de reagentes	Nome	Número necessário [§]
Rack de amostras	Rack de microtubos de eluição QS	1
Suportes de reagentes	Suporte de reagentes 1 QS	1
Racks de ensaios	Tubos em fitas RG 72 QS	1

[§] Calculado para um ensaio com 72 reações.

Ponteiras com filtro

Carregue os racks para ponteiras com os compartimentos 1, 2 e 3 na gaveta "Eluate and Reagents" (Eluído e reagentes) e, em seguida, carregue os racks para ponteiras com os compartimentos 7, 8 e 9 na gaveta "Assays" (Ensaio).

Produtos consumíveis	Nome na tela sensível ao toque	Número mínimo para 24 reações	Número mínimo para 72 reações
Ponteiras com filtro, 1500 μ l (1024)	1500 μ l	3	4
Ponteiras com filtro, 200 μ l (1024)	200 μ l	5	5
Ponteiras com filtro, 50 μ l (1024)	50 μ l	25	73
Sacos para descarte de ponteiras	-	1	1

RT-PCR no Rotor-Gene Q

Consulte a ficha de protocolo específica do software, "Configurações para executar os Kits artus QS-RGQ" (*Settings to run artus QS-RGQ Kits*), em www.qiagen.com/products/artusbkvirusrgpckit.aspx.

Configurações específicas do Kit *artus* BK Virus QS-RGQ

O Rotor-Gene AssayManager configura automaticamente os parâmetros do Kit *artus* BK Virus QS-RGQ.

Com o software Rotor-Gene 2.1, as configurações específicas são exibidas abaixo.

Volume de reação (μL)	50
Espera	Temperatura em espera: 95 graus Tempo de espera: 10 min
Ciclagem	45 vezes 95 graus por 15 s 65 graus por 30 s 72 graus por 20 s Ative a função de touchdown para 10 ciclos na etapa de emparelhamento.
Configuração da otimização de ganho automático	65 graus (Amostras: Green; IC: Orange)

Interpretação dos resultados

Esta seção descreve a interpretação dos resultados no Rotor-Gene Q. Para a análise do fluxo de trabalho completo da amostra até o resultado, avalie também as informações de status da amostra dos arquivos de resultado do QIASymphony SP/AS. Devem ser usadas apenas amostras com um status válido.

O Rotor-Gene AssayManager interpreta automaticamente os resultados da PCR e dá uma conclusão e um resultado quantitativo.

As seções a seguir descrevem a interpretação dos resultados com o uso do software Rotor-Gene 2.1 ou superior.

Detecção de sinal e conclusões – urina, 400 µl

Sinal no canal Cycling Green	Sinal no canal Cycling Orange	Resultado quantitativo (cópias/ml)	Interpretação
Sim	Sim	<81,8	Resultado válido: DNA do vírus BK detectado, <250 cópias/ml Não foi possível fazer a quantificação, pois o resultado quantitativo está abaixo do limite de detecção. A reprodutibilidade do resultado positivo não é garantida.
Sim	Sim	≥81,8 e <250	Resultado válido: DNA do vírus BK detectado, <250 cópias/ml Não foi possível fazer a quantificação, pois o resultado quantitativo está abaixo do intervalo linear do ensaio.
Sim	Sim	≥250 e ≤1 x 10 ⁹	Resultado válido: DNA do vírus BK detectado na concentração calculada O resultado quantitativo está dentro do intervalo linear do ensaio.
Sim	Sim	>1 x 10 ⁹	Resultado válido: DNA do vírus BK detectado, >1 x 10 ⁹ cópias/ml Não foi possível fazer a quantificação, pois o resultado quantitativo está acima do intervalo linear do ensaio.*
Não	Sim	–	Resultado válido: Nenhum DNA do vírus BK detectável.†
Não	Não	–	Resultado inválido: Nenhum resultado pode ser concluído.‡

* Se a quantificação for necessária, dilua a amostra com urina sem o vírus BK e reprocesse. Multiplique o resultado quantitativo da amostra reprocessada pelo fator de diluição.

† Se o valor de C_T para o controle interno de uma amostra negativa for mais de 3 ciclos maior do que o valor de C_T do controle interno do NTC (no template control, sem controle de modelo) no ensaio (C_{T IC amostra} – C_{T IC NTC} >3), a amostra deve ser tratada como inválida. Nenhum resultado pode ser concluído.

‡ As informações a respeito das origens dos erros e sua solução encontram-se no "Guia de solução de problemas" do Manual do Kit *artus BK Virus QS-RGQ* (*artus BK Virus QS-RGQ Kit Handbook*).

Configuração de limiar da análise de PCR

As configurações ideais de limiar de uma determinada combinação do instrumento Rotor-Gene Q e do Kit *artus* QS-RGQ devem ser definidas empiricamente, testando cada combinação, dado que se trata de um valor relativo que depende do fluxo de trabalho global do diagnóstico. O limiar pode ser definido em um valor preliminar de 0,04 para a análise do primeiro ensaio de PCR, mas esse valor deve ser ajustado em uma análise comparativa dos próximos ensaios do fluxo de trabalho. O limiar deve ser definido manualmente, logo acima do sinal de fundo dos controles negativos e amostras negativas. O valor médio do limiar calculado a partir desses experimentos provavelmente funcionará para a maioria dos próximos ensaios, mas o usuário deve, ainda assim, analisar o valor do limiar gerado regularmente. Normalmente, o valor do limiar ficará no intervalo de 0,03 a 0,05 e deve ser arredondado para no máximo três casas decimais.

Quantificação

Os padrões de quantificação (BK Virus RG QS 1–4) no Kit *artus* BK Virus QS-RGQ são tratados como amostras purificadas previamente, e o mesmo volume é usado (15 µl). Para gerar uma curva padrão nos instrumentos Rotor-Gene Q, os 4 padrões de quantificação devem ser utilizados e definidos na caixa de diálogo "Edit Samples" (Editar amostras) no instrumento Rotor-Gene Q como padrões com as concentrações especificadas (consulte o manual do usuário do instrumento).

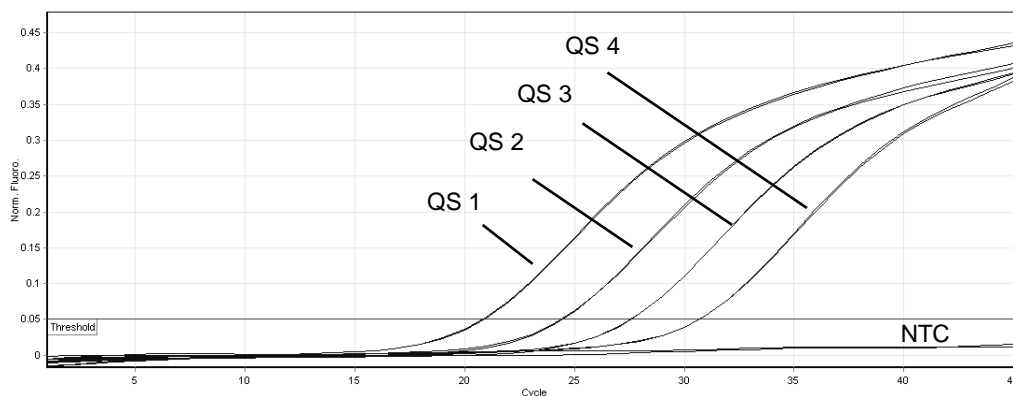
Nota: Os padrões de quantificação são definidos como cópias/µl. A equação a seguir deve ser aplicada para a conversão dos valores determinados utilizando a curva padrão em cópias/ml do material de amostra.

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

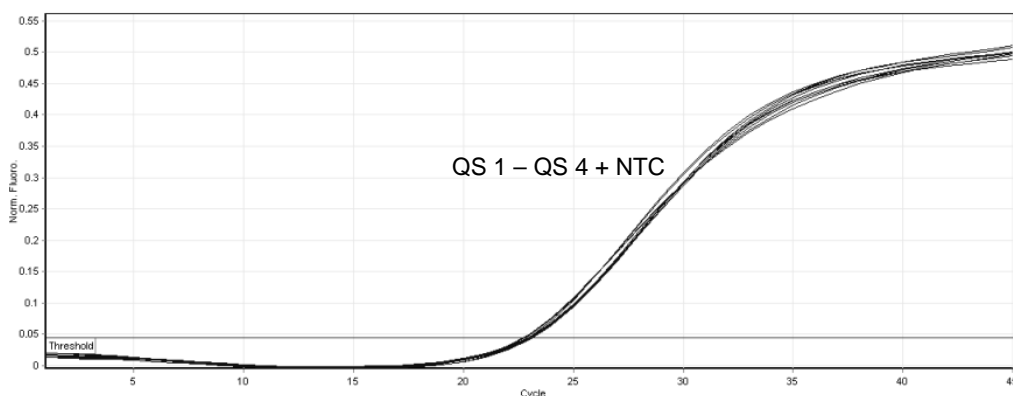
Por uma questão de princípio, o volume de amostra inicial deve ser inserido na equação acima. Isso deve ser considerado quando o volume da amostra tiver sido alterado antes da extração do ácido nucleico (p. ex., diminuindo o volume por centrifugação ou aumentando o volume ao completar o volume necessário ao isolamento).

* O cálculo baseia-se nos volumes iniciais de eluição (90 µl).

Exemplos de reações de PCR positivas e negativas



Deteção de padrões de quantificação (BK Virus RG QS 1–4) no canal de fluorescência Cycling Green. NTC: Sem controle de modelo (controle negativo).



Deteção do controle interno (IC) no canal de fluorescência Cycling Orange com amplificação simultânea dos padrões de quantificação (BK Virus RG QS 1–4). NTC: Sem controle de modelo (controle negativo).

Para obter informações de licenciamento atualizadas e os avisos legais específicos do produto, consulte o manual do usuário ou o manual de instruções do kit QIAGEN correspondente. Os manuais dos kits da QIAGEN e do usuário estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados aos Serviços técnicos ou ao distribuidor local da QIAGEN.

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

© 2012 QIAGEN, todos os direitos reservados.

www.qiagen.com

Canada = 800-572-9613

China = 021-3865-3865

Denmark = 80-885945

Finland = 0800-914416

France = 01-60-920-930

Germany = 02103-29-12000

Hong Kong = 800 933 965

Ireland = 1800 555 049

Italy = 800-787980

Japan = 03-6890-7300

Korea (South) = 1544 7145

Luxembourg = 8002 2076

Mexico = 01-800-7742-639

The Netherlands = 0800 0229592

Norway = 800-18859

Singapore = 65-67775366

Spain = 91-630-7050

Sweden = 020-790282

Switzerland = 055-254-22-11

UK = 01293-422-911

USA = 800-426-8157

Australia = 1-800-243-800

Austria = 0800/281010

Belgium = 0800-79612

Brazil = 0800-557779



Sample & Assay Technologies