

Folha de aplicação QIAasymphony® RGQ

Folha de aplicação do kit *artus*® HCV QS-RGQ para tipo de amostra de plasma

IVD



Verificar se há novas revisões de rotulagem eletrônica disponíveis em www.qiagen.com/artus-HCV-QS-RGQ-eL antes de realizar o teste. O estado de revisão atual é indicado pela data de lançamento (formato: mês/ano).

Setembro de 2015



Sample & Assay Technologies

Informações gerais

Kit	artus HCV QS-RGQ, versão 1, n° cat. 4518356
Material de amostras validado	Plasma humano tratado com EDTA
Kit de Purificação	Kit QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi (n° cat. 937055)
Volume da amostra	1200 µl
Conjunto de parâmetros de ensaio	artus_HCV_plasma1000_V4 ou superior
Conjunto de controle do ensaio predefinido	Cellfree1000_V6_DSP_artus_HCV ou superior
Volume de eluição	60 µl
Versão de software necessária	Versão 4.0 ou posterior
Volume de master mix	30 µl
Volume de eluído	20 µl
Número de reações	6-72
Tempo de corrida no módulo AS	Aproximadamente 9 minutos para 6 reações Aproximadamente 35 minutos para 72 reações

Materiais necessários, mas não fornecidos

Purification kit (Kit de purificação)	■	Kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi (n° cat. 937055)
Adapters for the QIASymphony SP (Adaptadores para o QIASymphony SP)	■	Elution Microtube Rack QS [rack de microtubos de eluição QS] (Cooling Adapter [adaptador de refrigeração], EMT, v2, Qsym, n° cat. 9020730)
	■	Tube Insert 3B [inserto de tubos 3B] (Insert [inserto], 2,0ml v2, samplecarr. [transportador de amostra] (24), Qsym, n° cat. 9242083)
Consumables for the QIASymphony SP (Consumíveis para o QIASymphony SP)	■	Sample Prep Cartridges, 8-well [cartuchos de prep. da amostra, 8 poços] (n° cat. 997002)
	■	8-Rod Covers [capas de 8 barras] (n° cat. 997004)
	■	Filter-Tips [ponteiras com filtro], 1500 µl (n° cat. 997024)
	■	Filter-Tips [ponteiras com filtro], 200 µl (n° cat. 990332)
	■	Elution Microtubes CL [microtubos de eluição CL] (n° cat. 19588)
	■	Tip disposal bags [saco de descarte de ponteiras] (n° cat. 9013395)
	■	Micro tubes 2.0 ml Type H [microtubos 2,0 ml tipo H] ou Micro tubes 2.0 ml Type I [microtubos 2,0 ml tipo I], (Sarstedt®, n° cat. 72.693 e 72.694, www.sarstedt.com)
Adapters and reagent holders for the QIASymphony AS (Adaptadores e suportes de reagentes para o QIASymphony AS)	■	Reagent holder 1 QS [suporte de reagente 1 QS] (Cooling Adapter [adaptador de refrigeração], Reagent Holder 1 [suporte de reagente 1], Qsym, n° cat. 9018090)
	■	Reagent holder 2 QS [suporte de reagente 2 QS] (Cooling Adapter [adaptador de refrigeração], Reagent Holder 2 [suporte de reagente 2], Qsym, n° cat. 9018089)
	■	RG Strip Tubes 72 QS [strips de tubos RG 72 QS] (Cooling Adapter [adaptador de refrigeração], RG Strip Tubes 72 [strips de tubos RG 72], Qsym, n° cat. 9018092)
Consumables for the QIASymphony AS (Consumíveis para o QIASymphony AS)	■	Strip Tubes and Caps [strips de tubos e tampas], 0,1 ml (n° cat. 981103)
	■	Tubes, conical [tubos, cônicos], 2 ml, Qsym AS (n° cat. 997102)* ou Micro tubes 2.0 ml Type I [microtubos 2,0 ml tipo I] (Sarstedt, n° cat. 72.694.005)
	■	Tube, conical [tubo, cônico], 5 ml Qsym AS (n° cat. 997104)* ou Tubes with flat base from PP [tubos com base plana de PP] (Sarstedt, n° cat. 60.558.001)
	■	Elution Microtubes CL [microtubos de eluição CL] (n° cat. 19588)
	■	Filter-Tips [ponteiras com filtro], 1500 µl (n° cat. 997024)
	■	Filter-Tips [ponteiras com filtro], 200 µl (n° cat. 990332)
	■	Filter-Tips [ponteiras com filtro], 50 µl (n° cat. 997120)
	■	Tip disposal bags [saco de descarte de ponteiras] (n° cat. 9013395)

* Verificar a disponibilidade em estoque.

Manuseio e armazenamento de amostras

Coleta da amostra	Amostra de sangue 5–10 ml de sangue tratado com EDTA Inverter 8x — não agitar! Não devem ser usadas amostras humanas tratadas com heparina
Armazenamento de amostras	de Separação: 20 minutos de centrifugação, 800–1600 x g dentro de 24 horas após a coleta Transferir o plasma isolado para um tubo de polipropileno estéril RNA de vírus encapsulados estável a:*
	■ 4 °C dias
	■ -20 °C semanas
	■ -70 °C meses
Transporte amostras	de Transporte à prova de estilhaço Envio no prazo de 24 horas Envio por correio de acordo com as instruções legais para o transporte de material patogênico† As amostras de sangue devem ser enviadas refrigeradas (2-8 °C)
Substâncias interferentes	A heparina (≥ 10 IU/ml) afeta a PCR. Não devem ser usadas amostras coletadas em tubos contendo heparina como anticoagulante, nem amostras de pacientes tratados com heparina. Elevados níveis de albumina (≤ 6 g/dl), bilirrubina (≤ 30 mg/dl), lípidos (≤ 1 g/dl triglicerídeos) e amostras hemolisadas (≤ 2 g/dl hemoglobina) não influenciam o sistema.

* Arbeitskreis Blut, V17 (09/1997), Bundesgesundheitsblatt 11/1997, p. 452–456.

† International Air Transport Association (IATA, Associação Internacional de Transporte Aéreo). Dangerous Goods Regulations (Regulamentos para Mercadorias Perigosas).

Procedimento

Preparação do Carreador de RNA (CARRIER) e acréscimo do controle interno às amostras

O uso do kit QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi em combinação com o kit *artus* HCV QS-RGQ requer a introdução do controle interno (Hep. C Virus RG IC) no procedimento de purificação para monitorar a eficiência da preparação da amostra e do processo "downstream".

Os controles internos devem ser adicionados à mistura Carreador de RNA (CARRIER)-tampão AVE (AVE), e o volume total da mistura de controle interno-Carreador de RNA (CARRIER)-tampão AVE (AVE) deve continuar igual a 120 μ l.

A tabela representa o acréscimo do controle interno à purificação numa proporção de 0,1 μ l por 1 μ l de volume de eluição. Recomenda-se utilizar a mistura imediatamente após o preparo da mesma (não armazenar para uso posterior).

Componente	Volume (µl) (tubos Sarstedt®)*	Volume (µl) (tubos Corning®)†
Carreador de RNA: solução estoque (CARRIER)	5	5
Controle interno‡	9	9
Tampão AVE	106	106
Volume final por amostra (excluindo volume morto)	120	120
Volume total para n amostras	(n x 120) + 360§	(n x 120) + 600¶

* Micro tubes 2.0 ml Type H [microtubos 2,0 ml tipo H] e Micro tubes 2.0 ml Type I [microtubos 2,0 ml tipo I] (Sarstedt, n° cat. 72.693 e 72.694.)

† Tubes 14 ml, 17 x 100 mm polystyrene round-bottom [tubos de base redonda de 14 ml, 17 x 100 mm de poliestireno] (Corning, n° cat. 352051).

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

§ É necessária uma mistura de controle interno correspondente a 3 amostras adicionais (ou seja, 360 µl). Não preencher cada tubo com volume superior a 1,92 ml de volume total (correspondente a um máximo de 13 amostras). Estes volumes são específicos para Micro tubes 2.0 ml Type H [microtubos 2,0 ml tipo H] e Micro tubes 2.0 ml Type I [microtubos 2,0 ml tipo I] (Sarstedt, n° cat. 72.693 e 72.694).

¶ É necessária uma mistura de controle interno correspondente a 5 amostras adicionais (ou seja, 600 µl). Não preencher cada tubo com volume superior a 13,92 ml de volume total (correspondente a um máximo de 111 amostras). Estes volumes são específicos para Tubes 14 ml, 17 x 100 mm polystyrene round-bottom [tubos de base redonda de 14 ml, 17 x 100 mm de poliestireno] (Corning, n° cat. 352051)

Configuração do QIASymphony SP

Gaveta "Waste" (Resíduos)

Suporte de caixa de unidades 1-4	Caixas de unidades vazias
Suporte de Saco de descarte	Saco de descarte
Suporte do frasco de resíduos líquidos	Esvaziar e instalar o frasco de resíduos líquidos

Gaveta "Eluate" (Eluído)

Rack de eluição	Usar posição 1, posição refrigerada
Volume de eluição*	Volume de eluição pré-selecionado: 60 μ l
	Volume de eluição inicial: 90 μ l

* O volume de eluição é pré-selecionado para o protocolo. Este é o volume acessível mínimo 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 pré-selecionado.

Gaveta "Reagents and Consumables" (Reagentes e consumíveis)

RC posição 1 e 2	Carregar 1 cartucho de reagente (RC) para um máximo de 48 amostras ou 2 cartuchos de reagente (RC) novos para um máximo de 96 amostras
Suporte do rack de ponteiras posição 1-4	Carregar quantidade suficiente de racks de ponteiras com filtro descartáveis suficientes, 200 μ l (ver "Material plástico necessário para 1-4 lotes de amostras", pág. 9)
Suporte do rack de ponteiras posição 5-18	Carregar quantidade suficiente de racks de ponteiras com filtro descartáveis suficientes, 1500 μ l (ver "Material plástico necessário para 1-4 lotes de amostras", pág. 9)
Suporte de caixa de unidades posição 1-3	Carregar 3 caixas de unidades contendo cartuchos de preparação de amostras (sample preps).
Suporte de caixa de unidades posição 4	Carregar 1 caixa de unidades contendo capas de 8 barras (8-rod covers).

Gaveta "Sample" (Amostra)

Tipo de amostra	Plasma
Volume da amostra (incluindo volume excedente)	1200 μ l
Tubos de amostras	Micro tubes 2.0 ml Type H [microtubos 2,0 ml tipo H] ou Micro tubes 2.0 ml Type I [microtubos 2,0 ml tipo I] (Sarstedt, n° cat. 72,693 e 72,694)
Inserto	Tube Insert 3B [inserto de tubo 3B] (n° cat. 9242083)

Material plástico necessário para 1-4 lotes de amostras

	1 lote, 24 amostras*	2 lotes, 48 amostras*	3 lotes, 72 amostras*	4 lotes, 96 amostras*
Ponteiras com filtro descartáveis, 200 μ l [†]	28	52	80	104
Ponteiras com filtro descartáveis, 1500 μ l [†]	85	162	247	324
Cartuchos de preparação de amostras (Sample Preps) [§]	21	42	63	84
Capas de 8 barras (8-Rod Covers) [¶]	3	6	9	12

* Utilizar mais de um tubo de controle interno por lote e realizar mais de uma inventariação requer ponteiras com filtro descartáveis adicionais.

† Há 32 ponteiras com filtro por rack de ponteiras.

‡ O número de ponteiras com filtro necessárias inclui ponteiras com filtro para uma inventariação por cartucho de reagente (RC).

§ Há 28 cartuchos de preparação de amostras (sample preps) por caixa de unidades.

¶ Há doze capas de 8 barras (8-rod covers) por caixa de unidades.

Configuração do QIASymphony AS

Consumíveis

Durante a configuração, as posições corretas para cada consumível no QIASymphony AS são indicadas na tela *touchscreen* do instrumento.

Consumíveis	Nome na tela <i>touchscreen</i>	Para uso com adaptador/suporte de reagente
Strips de tubos e tampas, 0,1 ml (250)	QIA#981103 *StripTubes 0.1	Strips de tubos RG 72 QS
Tubos, cônicos, 2 ml, Qsym AS (500) ^{†‡}	QIA#997102 *T2.0 ScrewSkirt [§]	Suporte de reagente 1 QS Suporte de reagente 2 QS
Tubo, cônico, 5 ml, Qsym AS (500) ^{†‡}	QIA#997104 *T5.0 ScrewSkirt [§]	Suporte de reagente 1 QS Suporte de reagente 2 QS
Microtubos de eluição CL (24 x 96)	QIA#19588 * EMTR	Rack de microtubos de eluição QS

* Indica o material de laboratório que pode ser refrigerado usando um adaptador de refrigeração com código de barras.

[†] Para componentes do master mix, master mix preparado pelo sistema, padrões de ensaio e controles de ensaio.

[‡] Como alternativa, podem ser usados os tubos Sarstedt descritos em "Materiais necessários, mas não fornecidos", página 3.

[§] O sufixo "(m)" na tela *touchscreen* indica que os cálculos de nível do líquido para o respectivo tubo foram otimizados para os reagentes formando um menisco côncavo.

Adaptadores e suportes de reagentes

Rack/suporte de reagentes	de Nome	Número necessário [†]
Sample rack (Rack de amostras)	de Elution Microtube Rack QS (Rack de 1 microtubos de eluição QS)	1
Reagent holders (Suportes de reagentes)	Reagent holder 1 QS (Suporte de reagente 1 QS)	1
Assay racks (Racks de ensaio)	de RG Strip Tubes 72 QS (Tiras de tubos RG 72 QS)	1

[†] Calculado para uma corrida de ensaio com 72 reações.

Ponteiras com filtro

Carregar a gaveta "Eluate and Reagents" (Eluído e reagentes) com racks de ponteiras, começando pelas posições de ponteiras 1, 2 e 3, e carregar depois a gaveta "Assays" (Ensaio) com racks de ponteiras, nas posições de ponteiras 7, 8 e 9.

Consumível	Nome na tela touchscreen	Número mínimo para 24 reações	Número mínimo para 72 reações
Ponteiras com filtro, 1500 µl (1024)	1500 µl	5	6
Ponteiras com filtro, 200 µl (1024)	200 µl	10	10
Ponteiras com filtro, 50 µl (1024)	50 µl	25	73
Saco de descarte de ponteiras	–	1	1

RT-PCR no Rotor-Gene Q

A reação do kit *artus* HCV QS-RGQ deve ser realizada no Rotor-Gene Q usando análise manual com o software Rotor-Gene Q 2.3 ou superior. Definir os seguintes parâmetros para a corrida.

Definição	Parâmetro
Volume de reação (μ L)	50
"Hold"	Temperatura: 50 graus Tempo: 30 minutos
"Hold 2"	Temperatura: 95 graus Tempo: 15 minutos
"Cycling"	50 vezes 95 graus durante 30 segundos 50 graus durante 60 segundos 72 graus durante 30 segundos
Configuração da otimização de ganho automático ("Gain optimization")	50 graus (Amostras: Verde; IC: Laranja)

Para instruções mais detalhadas, consultar "Definições de corrida dos kits *artus* QS-RGQ (software Rotor-Gene Q 2.3 ou superior)" em www.qiagen.com/artus-HBV-QS-RGQ-eL.

Interpretação dos resultados

Esta seção descreve a interpretação dos resultados no Rotor-Gene Q usando o software Rotor-Gene Q 2.3 ou superior. Conferir os arquivos de resultados do QIASymphony SP/AS para verificar o status da amostra. Devem ser utilizadas somente amostras definidas como válidas.

Informações sobre causas de erro e respectivas soluções podem ser encontradas no "Guia de resolução de problemas" do *manual do kit artus HCV QS-RGQ*.

Definições para a análise PCR

Para garantir que os dados gerados serão análogos às características de desempenho do kit *artus* HCV QS-RGQ, usar os seguintes parâmetros para analisar todos os dados gerados com o kit *artus* HCV QS-RGQ.

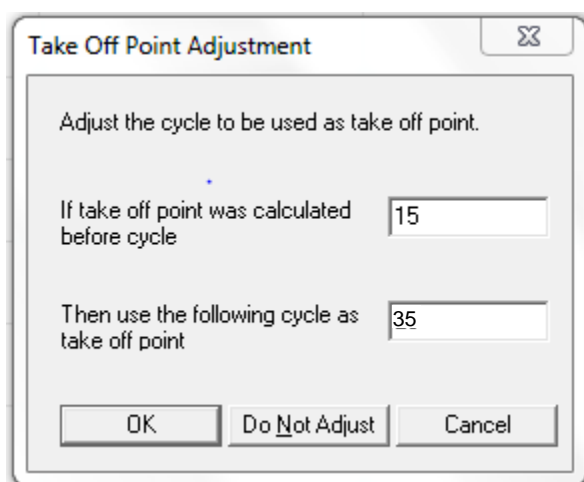
Definições para a análise PCR

Canal	Alvo	Limiar (Threshold)	Tubo dinâmico (Dynamic tube)	Correção de declive (Slope correct)	Ajuste de partida* (Take-off adjustment)
Verde	HCV	0,05	Ligado	Desligada	15/35
Laranja	IC†	0,03	Ligado	Ligada	15/35

* O ajuste de partida necessita do software RG na versão 2.3 ou superior.

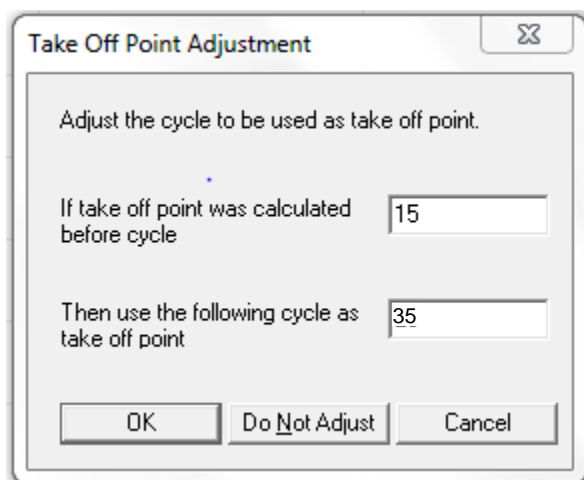
† IC: Controle interno.

1. Depois de concluída a corrida, analisar os dados com o software Rotor-Gene Q.
2. Abrir o arquivo da corrida (se estiver fechado) e selecionar "Analysis" (Análise) e "Cycling A.Green" (Ciclo A.Verde) para a análise da carga viral de HCV.
3. Selecionar "Dynamic tube" (Tubo dinâmico).
4. Certificar-se de que "Slope correct" (correção de declive) não está selecionado.
5. Selecionar "Take Off Adj." (Ajuste de partida) e inserir "15" na célula superior e "35" na célula inferior.



6. Definir o gráfico como escala linear e o limiar (threshold) como "0,05".
Os dados podem ser exportados clicando com o botão direito do mouse na janela "Results" (Resultados) e usando a função "Export to Excel" (Exportar para Excel).
7. Para a análise dos valores IC, selecionar "Analysis" (Análise) e "Cycling A. Orange" (Ciclo A. Laranja)
8. Selecionar "Dynamic tube" (Tubo dinâmico).
9. Selecionar "Slope correct" (Correção de declive).

-
10. Selecionar "Take Off Adj." (Ajuste de partida) e inserir "15" na célula superior e "35" na célula inferior.



11. Definir o gráfico como escala linear e o limiar (threshold) como "0,03".

Os dados podem ser exportados clicando com o botão direito do mouse na janela "Results" (Resultados) e usando a função "Export to Excel" (Exportar para Excel).

12. Converter os valores de titulação de IU/ μ l em IU/ml através da equação indicada em "Quantitation" (Quantificação), página 15.

Quantificação

Os padrões de quantificação (Hep. C Virus RG QS 1–4) do kit *artus* HCV QS-RGQ são tratados como amostras previamente purificadas, sendo utilizado o mesmo volume (20 µl) para a reação. Para gerar uma curva-padrão no Rotor-Gene Q, todos os 4 padrões de quantificação devem ser usados e definidos na caixa de diálogo "Edit Samples" (Editar amostras) no Rotor-Gene Q como padrões com as concentrações especificadas. Consultar o respectivo manual do usuário para obter mais instruções.

Nota: Os padrões de quantificação são definidos como IU/µl e foram calibrados utilizando o Padrão Internacional do HCV (OMS). A seguinte equação tem de ser aplicada para converter os valores determinados usando a curva-padrão para IU/ml de material de amostra. O cálculo é baseado nos volumes de eluição iniciais (90 µl).

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

Como regra geral, o volume de amostra inicial deve ser inserido na equação acima representada. Isto deve ser considerado quando o volume da amostra tiver sido alterado antes da extração do ácido nucleico (por ex.: reduzir o volume por centrifugação ou aumentar o volume por acréscimo ao volume necessário para a purificação).

Fator de conversão

Um IU/ml corresponde a 1,21 cópias/ml para a detecção de RNA de HCV no Rotor-Gene Q. O fator de conversão foi estabelecido por uma análise de regressão de diluições seriadas múltiplas em comparação com um relatório de método de referência em cópias/ml.

* * O padrão foi calibrado utilizando o Padrão Internacional do HCV (OMS).

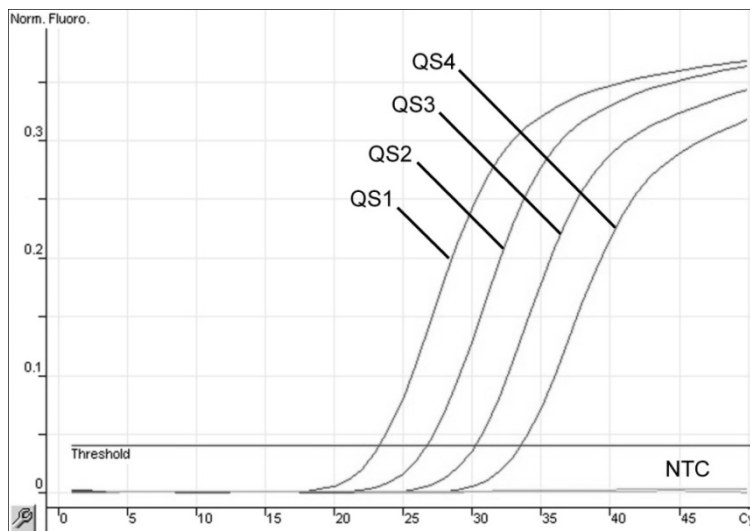
Detecção de sinal e conclusões

Sinal no canal Cycling Green	Sinal no canal Cycling Orange	Resultado quantitativo (IU/ml)	Interpretação
Sim	Sim	<21	Resultado válido: RNA de HCV detectado, <35 IU/ml* A quantificação não é possível, já que o resultado quantitativo está abaixo do limite de detecção. A reprodutibilidade do resultado positivo não é garantida.
Sim	Sim	≥ 21 e <35	Resultado válido: RNA de HCV detectado, <35 IU/ml* A quantificação não é possível, já que o resultado quantitativo está abaixo do intervalo linear do ensaio.
Sim	Sim/Não†	≥ 35 e $\leq 1,77 \times 10^7$	Resultado válido: RNA de HCV detectado na concentração calculada O resultado quantitativo está dentro do intervalo linear do ensaio.
Sim	Sim/Não†	$> 1,77 \times 10^7$	Resultado válido: RNA de HCV detectado, $> 1,77 \times 10^7$ IU/ml A quantificação não é possível, já que o resultado quantitativo está acima do intervalo linear do ensaio.
Não	Sim	–	Resultado válido: Não é detectável RNA de HCV.
Sim	Não	<35	Resultado inválido: Não é possível inferir nenhum resultado.
Não	Não	–	Resultado inválido: Não é possível inferir nenhum resultado.

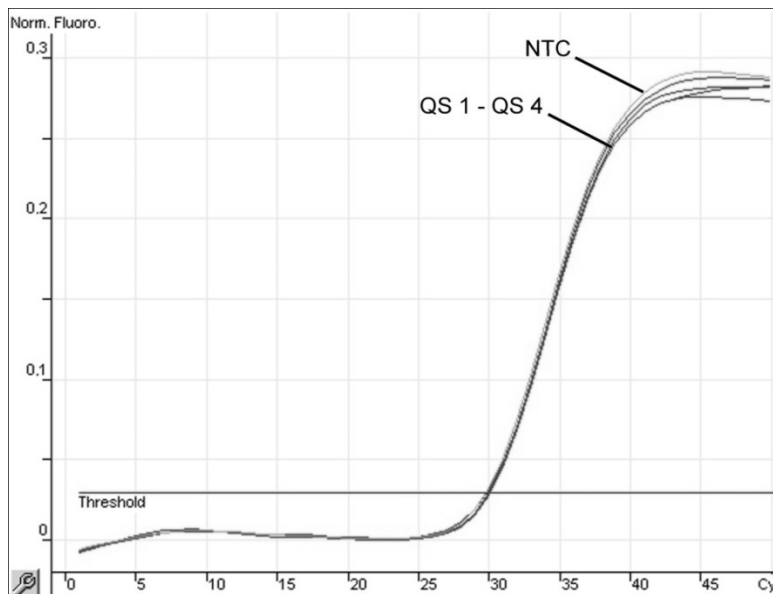
* Se o valor C_T para o controle interno de uma amostra abaixo do intervalo linear ou de uma amostra negativa for superior em mais de 3 ciclos ao valor C_T para o controle interno do NTC ($C_{T,IC} \text{ Amostra} - C_{T,IC} \text{ NTC} > 3$), então a amostra deve ser tratada como inválida. Não é possível inferir nenhum resultado.

† Neste caso, é dispensável a detecção de um sinal no canal Cycling Orange, já que as altas concentrações iniciais de RNA de HCV (sinal positivo no canal Cycling Green) podem levar a um sinal de fluorescência reduzido ou ausente do controle interno no canal Cycling Orange (competição).

Exemplos de reações PCR positivas e negativas



Deteção dos padrões de quantificação (Hep. C Virus QS 1–4) no canal de fluorescência Cycling Green. NTC: controle sem alvo (controle negativo).



Deteção do controle interno (IC) no canal de fluorescência Cycling Orange com amplificação simultânea dos padrões de quantificação (Hep. C Virus QS 1–4). NTC: controle sem alvo (controle negativo).

Para obter informações de licenciamento atualizadas e termos de isenção de responsabilidade específicos do produto, consultar o manual do usuário ou o manual de instruções do respectivo kit QIAGEN. Os manuais dos kits QIAGEN e manuais do usuário estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados à assistência técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

www.qiagen.com

Brasil = 0800-557779

Marcas registradas: QIAGEN®, QIASymphony®, *artus*®, Rotor-Gene® (Grupo QIAGEN); Corning® (Corning Incorporated); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.).

Setembro de 2015 HB-2002-S01-001 © 2015 QIAGEN, todos os direitos reservados.