

Aplikační list QIASymphony® RGQ

Aplikační list QIASymphony RGQ artus® BK Virus QS-RGQ Kit (typ vzorku: moč, 400 µl)



Před samotným testem si ověřte dostupnost nových revizí elektronického značení na adrese www.qiagen.com/products/artusbkvirusrgqcrkit.aspx Současný stav revize je vyznačen datem vydání (formát: měsíc/rok).

Všeobecné informace

Diagnostická souprava	artus BK Virus QS-RGQ Kit, verze 1, REF 4514363
Validovaný materiál vzorku	Moč
Čištění na předním konci	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (kat. č. 937055)
Objem vzorku (včetně nadbytečného objemu)	500 µl
Sada parametrů	artus_BKV_urine400_V4
Výchozí kontrolní sada	Complex400_V4_DSP_artus_BKV
Eluční objem	60 µl
Požadovaná verze softwaru	Verze 4.0 nebo vyšší
Objem master mixu	10 µl
Objem templátu	15 µl
Počet reakcí	6–24*
Doba chodu na modulu AS	Pro 6 reakcí přibližně 8 minut Pro 72 reakcí přibližně 35 minut

* U nastavení testu pro BK virus lze nastavit až 216 (9 x 24) rozborů v jednom běhu na přístroji QIASymphony AS.

Květen 2012



Sample & Assay Technologies

Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky

Purifikační sada	■	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (kat. č. 937055)
Adaptéry pro QIASymphony SP	■	Stojánek na eluční mikrozkušavky QS (Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym, kat. čís. 9020730)
	■	Vložka pro zkumavky 3B (Insert, 2.0ml v2, samplecarr. (24), Qsym, kat. čís. 9242083)
Spotřební materiál pro QIASymphony SP	■	Sample Prep Cartridges, 8-well (8jamkové zásobníky na přípravu vzorku) (kat. čís. 997002)
	■	8-Rod Covers (kryty hrotů (po osmi)) (kat. čís. 997004)
	■	Filter-Tips (špičky s filtrem), 1500 µl (kat. čís. 997024)
	■	Filter-Tips (špičky s filtrem), 200 µl (kat. čís. 990332)
	■	Elution Microtubes CL (eluční mikrozkušavky CL) (kat. čís. 19588)
	■	Tip disposal bags (odpadní sáčky na špičky) (kat. čís. 9013395)
	■	Micro tubes 2.0 ml Type H or Micro tubes 2.0 ml Type I (2ml mikrozkušavky typu H nebo 2ml mikrozkušavky typu I) (Sarstedt, kat. čís. 72.693 a 72.694, www.sarstedt.com) pro použití se vzorky a interními kontrolami
Adaptéry a držáky na reagentie pro QIASymphony AS	■	Držák na reagentie 1 QS (Cooling Adapter, Reagent Holder 1, kat. čís. 9018090)
	■	Držák na reagentie 2 QS (Cooling Adapter, Reagent Holder 2, kat. čís. 9018089)
	■	RG stripy se zkumavkami 72 QS (Cooling Adapter, RG Strip Tubes 72, Qsym, kat. čís. 9018092)
Spotřební materiál pro QIASymphony AS	■	Strip Tubes and Caps (stripy se zkumavkami a víčky), 0.1 ml (kat. čís. 981103)
	■	Tubes, conical, 2 ml (2ml kónické zkumavky), Qsym AS (kat. čís. 997102)* nebo Micro tubes 2.0 ml Type I (2ml mikrozkušavky typu I) (Sarstedt, kat. čís. 72.694.005)
	■	Tube, conical, 5 ml (5ml kónická zkumavka), Qsym AS (kat. čís. 997104)* nebo Tubes with flat base from PP (polypropylenové zkumavky s plochým podstavcem) (Sarstedt, kat. čís. 60.558.001)
	■	Reagent Bottles (reagenční lahvičky), 30 ml, Qsym AS (kat. čís. 997108)
	■	Elution Microtubes CL (eluční mikrozkušavky CL) (kat. čís. 19588)
	■	Filter-Tips (špičky s filtrem), 1500 µl (kat. čís. 997024)
	■	Filter-Tips (špičky s filtrem), 200 µl (kat. čís. 990332)
	■	Filter-Tips (špičky s filtrem), 50 µl (kat. čís. 997120)
	■	Tip disposal bags (odpadní sáčky na špičky) (kat. čís. 9013395)
Pro přípravu vzorků (moč)	■	Buffer ATL, GPR (pufr ATL, GPR) (katalogové číslo 939016)

* Prosím informujte se o dostupnosti.

Uchovávání a nakládání se vzorky

Sběr vzorků	Lidská moč
Přeprava vzorků	Přeprava chránící před otřesy Přeprava do 6 hodin Poštovní přeprava podle právních pokynů pro přepravu patogenního materiálu*
Příprava vzorku	Zamezte vytvoření pěny na nebo ve vzorcích. Vzorky by měly být před začátkem protokolu ekvilibrovány na pokojovou teplotu (15–25°C).

* International Air Transport Association (Mezinárodní asociace leteckých dopravců) (IATA). Dangerous Goods Regulations (Předpisy pro přepravu nebezpečného zboží).

Postup

Příprava RNA nosiče a přidavek interní kontroly ke vzorkům

Použití sad QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi ve spojení se sadou *artus* BK Virus QS-RGQ vyžaduje zapojení interní kontroly (BK Virus RG IC) do purifikační procedury, aby se mohla monitorovat efektivita přípravy vzorku a následných rozborů.

Interní kontroly se musí přidávat spolu se směsí RNA nosiče (CARRIER) a pufru AVE (AVE). Celkový objem směsi interní kontroly, RNA nosiče (CARRIER) a pufru AVE (AVE) zůstává 120 µl.

Tabulka udává přidavek interní kontroly k izolaci v poměru 0,1 µl na 1 µl elučního objemu. Doporučujeme připravit pro každý běh čerstvé směsi bezprostředně před použitím.

Komponenta	Objem (µl) (zkumavky Sarstedt®)*	Objem (µl) (zkumavky BD™)†
Základní carrier RNA (CARRIER)	3	3
Interní kontrola‡	9	9
Pufř AVE	108	108
Konečný objem na jeden vzorek (vyjma mrtvého objemu)	120	120
Celkový objem pro n vzorků	(n x 120) + 360§	(n x 120) + 600¶

* 2ml mikrozkušavky typu H a 2ml mikrozkušavky typu I, Sarstedt, kat. čís. 72.693 a 72.694.

† Zkušavky 14 ml, 17 x 100 mm polystyrénové zkušavky s kulatým dnem (Becton Dickinson, kat. č. 352051).

‡ Výpočet množství interní kontroly se zakládá na výchozích elučních objemech (90 µl). Dodatečný mrtvý objem závisí na typu použité zkušavky na vzorek.

§ Vyžaduje se směs interní kontroly odpovídající 3 přídavných vzorků (tj. 360 µl). Neplňte více než na celkový objem 1,92 ml (odpovídající maximu 13 vzorků). Tyto objemy jsou specifické pro 2ml mikrozkušavky typu H nebo 2ml mikrozkušavky typu I (Sarstedt, kat. čís. od 72.693 do 72.694).

¶ Vyžaduje se směs interní kontroly odpovídající 5 přídavných vzorků (tj. 600 µl). Neplňte více než na celkový objem 13,92 ml (odpovídající maximu 111 vzorků). Zkušavky 14 ml, 17 x 100 mm polystyrénové zkušavky s kulatým dnem (Becton Dickinson, kat. č. 352051).

Nastavení QIASymphony SP

Zásuvka “Waste” (Odpad)

Držák jednotkové krabice 1—4	Prázdné jednotkové krabice
Držák odpadních sáčků	Odpadní sáček
Držák lahve na kapalný odpad	Vyprázdněte a vložte nádobu na tekutý odpad

Zásuvka “Eluate” (Eluát)

Eluční stojánek	Použijte chladicí pozici, slot 1
Eluční objem*	Předvolený eluční objem: 60 µl Výchozí eluční objem: 90 µl

* Eluční objem je předvolený pro protokol. Toto je minimální dosažitelné množství eluátu ve výsledné eluční zkumavce. Původní objem elučního roztoku je vyžadován, aby bylo zajištěno, že skutečný objem eluátu odpovídá předvolenému objemu.

Zásuvka “Reagents and Consumables” (Reagencie a spotřební díly)

Poloha A1 a/nebo A2	Vložte 1 zásobník s reagensy (RC) pro až 48 vzorků plazmy nebo 2 nové zásobníky s reagensy (RC) pro až 96 vzorků
Poloha B1	Pufr ATL (ATL)
Držák stojánků se špičkami pozice 1–17	Vložte dostatečné množství stojánků jednorázových špiček s filtrem, 200 µl a 1500 µl (viz “Požadovaný plastový materiál pro 1–4 sady vzorků”, stránka 6)
Držák boxů s jednotkami pozice 1–4	Vložte jednotkové krabice obsahující zásobníky vzorových preparátů a 8tyčové kryty (viz “Požadovaný plastový materiál pro 1–4 sady vzorků”, stránka 6)

Zásuvka "Sample" (Vzorek)

Typ vzorku	Moč
Objem vzorku (včetně nadbytečného objemu)	500 µl
Zkumavky na vzorky	2ml mikrozskumavky typu H nebo 2ml mikrozskumavky typu I (Sarstedt, kat. čís. 72.693 a 72.694).
Vložky	Vložka pro zkumavky 3B (kat. čís. 9242083)

Požadovaný plastový materiál pro 1–4 sady vzorků

	Jedna sada, 24 vzorků*	Dvě šarže, 48 vzorků*	Tři sady, 72 vzorků*	Čtyři šarže, 96 vzorků*
Jednorázové špičky s filtrem, 200 µl ^{†‡}	34	60	86	112
Jednorázové špičky s filtrem, 1500 µl ^{†‡}	123	205	295	385
Zásobníky pro přípravu vzorků [§]	18	36	54	72
8tyčové kryty [¶]	3	6	9	12

* Užití více než jedné zkumavky s interní kontrolou na jednu sadu a provedení více než jedné kontroly vloženého obsahu vyžaduje dodatečné jednorázové špičky s filtrem.

† Jeden stojánek na špičky obsahuje 32 špiček s filtrem.

‡ Počet požadovaných filtračních špiček zahrnuje filtrační špičky pro 1 snímek inventáře na kazetu s reagensy.

§ Je tu 28 kazet s preparáty vzorku/jednotková krabice.

¶ Je tu dvanáct 8tyčových krytů/jednotková krabice.

Nastavení QIASymphony AS

Spotřební díly

Během nastavení jsou na dotykové obrazovce přístroje vyznačeny příslušné pozice pro každý spotřební díl na modulu QIASymphony AS.

Spotřební díly	Název na dotekové obrazovce	Pro použití s adaptérem/držákem na reagentie
Stripy se zkumavkami a víčky, 0,1 ml (250)	QIA#981103 *StripTubes 0.1	RG stripy se zkumavkami 72 QS
Kónické zkumavky, 2 ml, Qsym AS (500)	QIA#997102 *T2.0 ScrewSkirt [‡]	Držák na reagentie 1 QS Držák na reagentie 2 QS
Kónická zkumavka, 5 ml, Qsym AS (500)	QIA#997104 *T5.0 ScrewSkirt [‡]	Držák na reagentie 1 QS Držák na reagentie 2 QS
30 ml reagentní lahvičky Qsym AS (50)*	QIA#997108 *Bottle 30ml [‡]	Držák na reagentie 2 QS
Eluční mikrozukavky CL (24 x 96)	QIA#19588 * EMTR	Stojánek na eluční mikrozukavky QS

* Pro komponenty master mixu, systémem připravený master mix, standardy a kontroly.

* Alternativně lze použít zkumavky Sarstedt uvedené na "Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky" straně 2.

‡ Přípona "(m)" na dotekové obrazovce ukazuje, že výpočet hladiny tekutiny u příslušné zkumavky byl optimalizován pro reagentie tvořící konkávní meniskus.

Adaptéry a držáky na reagentie

Stojánek/držák na reagentie	Název	Požadovaný počet [§]
Stojánek pro vzorky	Stojánek na eluční mikrozukavky QS	1
Držáky na reagentie	Držák na reagentie 1 QS	1
Stojánky pro rozbor	RG stripy se zkumavkami 72 QS	1

§ Vypočítáno pro rozbor se 72 reakcemi.

Špičky s filtrem

Vložte stojánky na špičky počínaje drážkami 1, 2 a 3 do zásuvky "Eluate and Reagents" (Eluáty a reagentie) a poté vložte držáky na špičky do drážek 7, 8 a 9 v zásuvce "Assays" (Rozbory).

Spotřební materiál	Název na dotekové obrazovce	Minimální počet pro 24 reakcí	Minimální počet pro 72 reakcí
Špičky s filtrem, 1500 µl (1024)	1500 µl	3	4
Špičky s filtrem, 200 µl (1024)	200 µl	5	5
Špičky s filtrem, 50 µl (1024)	50 µl	25	73
Odpadní sáček na špičky	–	1	1

RT-PCR na Rotor-Gene Q

Další informace viz list protokolu specifického pro software "Settings to run *artus* QS-RGQ Kits" (Nastavení pro spuštění sad *artus* QS-RGQ) naleznete na adrese www.qiagen.com/products/artusbkvirusrgpckit.aspx.

Specifická nastavení pro sadu *artus* BK Virus QS-RGQ

Rotor-Gene AssayManager automaticky nastavuje parametry pro sadu *artus* BK Virus QS-RGQ.

Specifická nastavení softwaru Rotor-Gene 2.1 jsou uvedena níže.

Reakční objem (µl)	50
Držet	Teplota zdržení: 95 stupňů Doba zdržení: 10 minut
Cyklování	45krát 95 stupňů po 15 s 65 stupňů po 30 s 72 stupňů po 20 s Ujistěte se, že je dotyková funkce u kroku žihání aktivována pro 10 cyklů.
Nastavení optimalizace automatického zesílení	65 stupňů (Vzorky: zelená; IC: oranžová)

Interpretace výsledků

Tato část popisuje interpretaci výsledků na Rotor-GeneQ. Provéřte také informace o stavu vzorku ze souborů s výsledky QIASymphony SP/AS k analýze úplného pracovního toku od vzorku k výsledku. Je nutné používat pouze vzorky s platným stavem.

Rotor-Gene AssayManager automaticky interpretuje výsledky PCR a poskytuje závěr a kvantitativní výsledek.

Následující části popisují interpretaci výsledků pomocí softwaru Rotor-Gene 2.1 nebo vyšším.

Detekce signálu a závěry — moč 400 µl

Signál v kanálu Cycling Green	Signál v kanálu Cycling Orange	Kvantitativní výsledek (kopie/ml)	Interpretace
Ano	Ano	<81,8	Platný výsledek: detekovaná DNA BK viru, <250 kopií/ml Kvantifikace není možná, protože výsledek kvantifikace je pod mezí detekce. Reprodukovatelnost pozitivního výsledku není zajištěna.
Ano	Ano	≥81,8 a <250	Platný výsledek: detekovaná DNA BK viru, <250 kopií/ml Kvantifikace není možná, protože výsledek kvantifikace je pod lineárním rozsahem rozboru.
Ano	Ano	≥250 a ≤1 x 10 ⁹	Platný výsledek: Detekovaná DNA BK viru při vypočítané koncentraci Kvantitativní výsledek je v lineárním rozmezí rozboru.
Ano	Ano	>1 x 10 ⁹	Platný výsledek: Detekovaná DNA BK viru, >1 x 10 ⁹ kopie/ml Kvantifikace není možná, protože výsledek kvantifikace je nad lineárním rozsahem rozboru.*
Ne	Ano	–	Platný výsledek: Není detekovatelná žádná DNA BK viru.†
Ne	Ne	–	Neplatný výsledek: Není možné učinit závěr.‡

* Pokud se požaduje kvantifikace, naředte vzorek močí bez BK viru a znovu zpracujte. Kvantifikační výsledek z opakovaně zpracovaného vzorku vynásobte faktorem ředění.

† Pokud je ovšem C_T hodnota interní kontroly negativního vzorku po více než 3 cykly vyšší než C_T hodnota interní kontroly beztemplátové kontroly (C_{T IC Sample} – C_{T IC NTC} >3), měl by být tento vzorek považován za neplatný. Není možné učinit závěr.

‡ Informace ohledně zdrojů chyb a jejich řešení lze nalézt v "Troubleshooting guide" (Průvodce odstraňováním závad) *artus BK Virus QS-RGQ Kit Manuál (artus BK Virus QS-RGQ Kit Handbook)*.

Nastavení prahové hodnoty pro analýzu PCR

Optimální nastavení mezní hodnoty pro danou kombinaci Rotor-Gene Q přístroje a sady artus QSRGQ by mělo být empiricky stanoveno testováním každé individuální kombinace, protože se jedná o relativní hodnotu závislou na celkovém diagnostickém pracovním postupu. Mezní hodnota může být nastavena na úvodní hodnotu 0,04 pro analýzu prvního PCR běhu. Tato hodnota by ale měla být doladěna v komparativní analýze dalších běhů v pracovním schématu. Mezní hodnota by měla být nastavena manuálně těsně nad signál pozadí negativních kontrol a negativních vzorků. Průměrná mezní hodnota vypočítaná z těchto pokusů by měla s velkou pravděpodobností platit i pro většinu následujících běhů. Uživatel by přesto měl generované mezní hodnoty pravidelně kontrolovat. Mezní hodnota se pohybuje obvykle mezi 0,03–0,05 a měla by se zaokrouhlovat na maximálně tři desetinná místa.

Kvantifikace

S kvantifikačními standardy (BK Virus RG QS 1–4) dodávanými se sadou *artus* BK Virus-1 QS-RGQ se zachází stejně jako s již izolovanými vzorky a přidávají se ve stejném objemu (15 µl). Standardní křivku na přístroji Rotor-Gene Q vytvoříte tak, že vložíte všechny čtyři kvantifikační standardy, definujete je v okně menu "Edit Samples" (Upravit vzorky) přístroje Rotor-Gene Q jako standardy a zadáte uvedené koncentrace (viz uživatelský manuál přístroje).

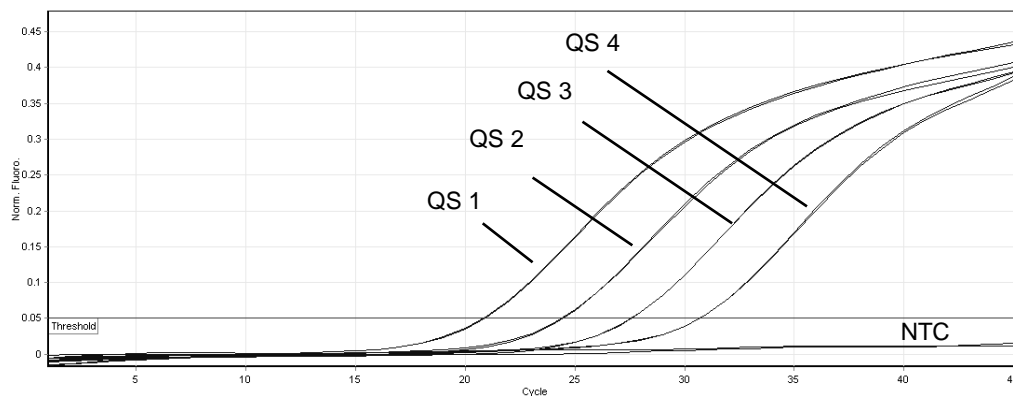
Poznámka: Kvantifikační standardy jsou definovány jako kopie/µl. Pro přepočet hodnot získaných pomocí standardní křivky na kopie/ml vzorku se používá následující vzorec.

$$\begin{array}{l} \text{Výsledek} \\ \text{(kopie/ml)} \end{array} = \frac{\text{výsledek (kopie/}\mu\text{l)} \times \text{původní eluční objem (90 }\mu\text{l)*}}{\text{objem vzorku (ml)}}$$

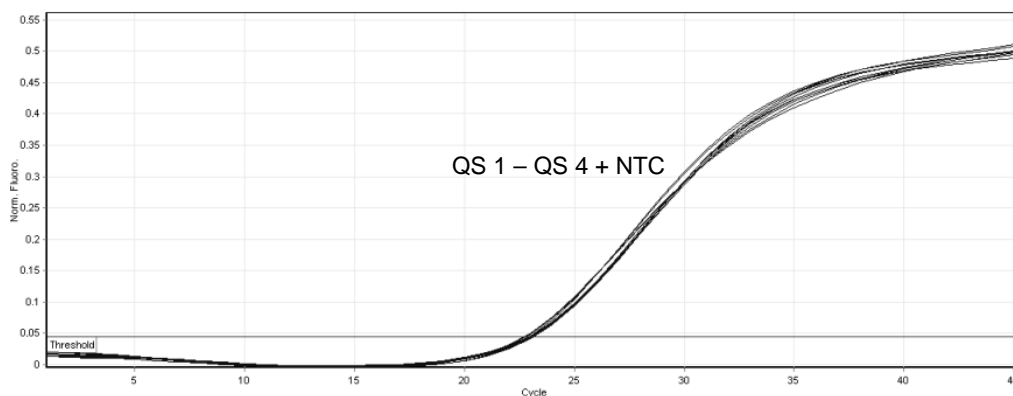
Do výše uvedeného vzorce se dosazuje zásadně původní objem vzorku. Toto se musí zohlednit, byl-li objem vzorku před izolací nukleových kyselin pozměněn (např. redukce objemu centrifugací nebo jeho zvýšení naplněním na objem požadovaný pro izolaci).

* Výpočet se zakládá na výchozích elučních objemech (90 µl).

Příklady pozitivních a negativních reakcí PCR



Průkaz kvantifikačních standardů (BK Virus RG QS 1–4) ve fluorescenčním kanálu Cycling Green. NTC: Beztemplátová kontrola (negativní kontrola).



Průkaz interní kontroly (IC) ve fluorescenčním kanálu Cycling Orange při současné amplifikaci kvantifikačních standardů (BK Virus RG QS 1–4). NTC: Beztemplátová kontrola (negativní kontrola).

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro sadu QIAGEN nebo příručce uživatele. Příručky a uživatelské návody sady QIAGEN jsou k dispozici na stránkách www.qiagen.com nebo si je lze vyžádat u Technických služeb QIAGEN nebo svého lokálního distributora.

Ochranné známky: QIAGEN[®], QIASymphony[®], *artus*[®], Rotor-Gene[®] (QIAGEN Group); BD[™] (Becton, Dickinson and Company); Sarstedt[®] (Sarstedt AG and Co.).

© 2012 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

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