

Abril de 2019

Hoja de aplicación del instrumento QIASymphony[®] RGQ

artus[®] VZV QS-RGQ Kit (tipo de muestra: plasma)

R2

IVD

CE

REF

4502363

artus VZV QS-RGQ Kit, versión 1



Compruebe la disponibilidad de nuevas versiones de la documentación electrónica en www.qiagen.com/products/artusvzvpcrkitce.aspx antes de realizar la prueba.

Información general

Kit	<i>artus</i> VZV QS-RGQ Kit, versión 1 (n.º de referencia 4502363)
Materiales de muestra validados	Plasma humano con EDTA
Purificación inicial	QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (n.º de referencia 937055)
Volumen de muestra (incluido el volumen sobrante)	1200 µl
Conjunto de parámetros de ensayo	<i>artus_VZV_plasma1000_V5</i>
Conjunto de controles del ensayo predeterminado	Cellfree1000_V7_DSP_ <i>artus_VZV</i>
Volumen de elución	60 µl
Versión del software requerida	Versión 4.0 o superior
Volumen de mezcla maestra	30 µl
Volumen de molde	20 µl
Número de reacciones	6-24
Tiempo de procesamiento en el módulo AS	Para 6 reacciones: aproximadamente 9 minutos Para 72 reacciones: aproximadamente 35 minutos

Materiales necesarios pero no suministrados

Kit de purificación

- QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (n.º de referencia 937055)

Adaptadores para el instrumento QIASymphony SP

- Elution Microtube Rack QS (Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym, n.º de referencia 9020730)
- Marco de transferencia
- Tube Insert 3B (inserto, 2,0 ml v2, soporte para muestras (24), Qsym, n.º de referencia 9242083)

Consumibles para el instrumento QIASymphony SP

- Sample Prep Cartridges, 8-well (n.º de referencia 997002)
- 8-Rod Covers (n.º de referencia 997004)
- Filter-Tips, 1500 µl (n.º de referencia 997024)
- Filter-Tips, 200 µl (n.º de referencia 990332)
- Elution Microtubes CL (n.º de referencia 19588)
- Tip disposal bags (n.º de referencia 9013395)
- Micro tubes 2.0 ml Type H o Micro tubes 2.0 ml Type I (Sarstedt®, n.º de referencia 72.693 y 72.694, www.sarstedt.com) para uso con muestras y controles internos

Adaptadores y soportes para reactivos para el instrumento QIASymphony AS

- Reagent holder 1 QS (Cooling Adapter, Reagent Holder 1, Qsym, n.º de referencia 9018090)
- RG Strip Tubes 72 QS (Cooling Adapter, RG Strip Tubes 72, Qsym, n.º de referencia 9018092)

Consumibles para el instrumento QIASymphony AS

- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (n.º de referencia 981103)
- Tubes, conical, 2 ml, Qsym AS (n.º de referencia 997102) o Micro tubes 2.0 ml Type I (Sarstedt, n.º de referencia 72.694.005)
- De forma alternativa: Tubes, conical, 5 ml, Qsym AS (n.º de referencia 997104) o Tubes with flat base from PP (Sarstedt, n.º de referencia 60.558.001)
- Filter-Tips, 1500 µl (n.º de referencia 997024)
- Filter-Tips, 200 µl (n.º de referencia 990332)
- Filter-Tips, 50 µl (n.º de referencia 997120)
- Tip disposal bags (n.º de referencia 9013395)

Manipulación y almacenamiento de muestras

Recogida de las muestras	Muestra de sangre 5-10 ml de sangre con EDTA Mezcla superior (x 8), sin agitación No deben usarse muestras humanas heparinizadas.
Almacenamiento de las muestras	Separación: 20 minutos de centrifugación, 800-1.600 x g en las 24 horas siguientes a la recogida. Transfiera el plasma aislado a un tubo de polipropileno estéril. La sensibilidad del ensayo puede verse reducida si se congelan las muestras de forma sistemática o si se almacenan durante un período de tiempo mayor.
Transporte de las muestras	Transporte en recipiente irrompible. Envío en un plazo de 24 horas. Envío por correo conforme a la normativa legal para el transporte de materiales patógenos*. Las muestras de sangre deben enviarse refrigeradas (entre 2 y 8 °C).
Sustancias interferentes	La heparina (≥ 10 UI/ml) afecta a la PCR. No deben usarse muestras recogidas en tubos que contengan heparina como anticoagulante ni muestras de pacientes heparinizados.
Preparación de las muestras	Evite la formación de espuma en el interior o en la superficie de las muestras. Las muestras deben equilibrarse a temperatura ambiente (15–25 °C) antes de comenzar el ciclo.

* Asociación internacional para el transporte aéreo (International Air Transport Association, IATA). Dangerous Goods Regulations (Normativa sobre mercancías peligrosas).

Procedimiento

Preparación del ARN transportador y adición del control interno a las muestras

El uso del QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit en combinación con el *artus* VZV QS-RGQ Kit requiere la introducción del control interno (VZV IC) en el procedimiento de purificación para vigilar la eficiencia de la preparación de las muestras y del ensayo posterior.

Es preciso añadir controles internos con la mezcla ARN transportador (CARRIER)-Buffer AVE (AVE); el volumen total de la mezcla control interno-ARN transportador (CARRIER)-Buffer AVE (AVE) sigue siendo de 120 µl.

La tabla representa la adición del control interno para el aislamiento con una relación de 0,1 µl por 1 µl del volumen de elución. Recomendamos preparar mezclas frescas para cada serie justo antes del uso.

De forma alternativa, se puede usar la herramienta "IC Calculator" (Calculadora del IC) en QIASymphony Management Console.

Componente	Volumen (µl) (tubos Sarstedt)*	Volumen (µl) (tubos Corning)†
ARN transportador (CARRIER) de partida	5	5
Control interno‡	9	9
Buffer AVE	106	106
Volumen final por muestra (excluido el volumen muerto)	120	120
Volumen total para n muestras	$(n \times 120) + 360^{\S}$	$(n \times 120) + 600^{\parallel}$

* Micro tubes 2.0 ml Type H y Micro tubes 2.0 ml Type I, Sarstedt, n.º de referencia 72.693 y 72.694.

† Tubes 14 ml, 17 x 100 mm polystyrene round-bottom (Corning®, n.º de referencia 352051; Becton Dickinson era el proveedor anterior de estos tubos; Corning, Inc. es el nuevo proveedor).

‡ El cálculo de la cantidad de control interno se basa en los volúmenes de elución iniciales (90 µl). El volumen vacío adicional depende del tipo de tubo de muestras usado.

§ Se requiere la mezcla del control interno correspondiente a 3 muestras adicionales (es decir, 360 µl). No debe superarse un volumen total de llenado de 1,92 ml (que corresponde a un máximo de 13 muestras). Estos volúmenes son específicos para Micro tubes 2.0 ml Type H y Micro tubes 2.0 ml Type I, Sarstedt, n.º de referencia 72.693 y 72.694).

¶ Se requiere la mezcla del control interno correspondiente a 5 muestras adicionales (es decir, 600 µl). No debe superarse un volumen total de llenado de 13,92 ml (que corresponde a un máximo de 111 muestras). Estos volúmenes son específicos para Tubes 14 ml, 17 x 100 mm polystyrene round-bottom, Corning Inc., ref 352051; Becton Dickinson era el proveedor anterior de estos tubos y Corning Inc. es ahora el nuevo proveedor).

Configuración del instrumento QIASymphony SP

Cajón "Waste" (residuos)

Soporte de caja unitaria 1–4	Cajas unitarias vacías
Soporte de la bolsa de desechos	Bolsa de desechos
Soporte para frasco de desechos líquidos	Vacíe e instale el frasco de desechos líquidos

Cajón "Eluate" (eluidos)

Gradilla de elución	Elution Microtubes CL en Elution Microtube Rack QS y marco de transferencia Utilice la ranura 1, posición de refrigeración
Volumen de elución*	Volumen de elución preseleccionado: 60 µl Volumen de elución inicial: 90 µl

* El volumen de elución está preseleccionado para el protocolo. Se trata del volumen accesible mínimo de eluido presente en el tubo de elución final. El volumen inicial de la solución de elución es necesario para garantizar que el volumen real de eluido sea el mismo que el volumen preseleccionado.

Cajón "Reagents and Consumables" (reactivos y consumibles)

RC, posiciones 1 y 2	Cargue 1 cartucho de reactivos (Reagent Cartridge, RC) para un máximo de 48 muestras o 2 cartuchos de reactivos (RC) nuevos para un máximo de 96 muestras
Soporte de gradilla de puntas, posiciones 1-18	Cargue suficientes gradillas de puntas con filtro desechables de 200 µl y 1500 µl (ver "Material de plástico necesario para 1–4 lotes de muestras", página 7)
Soporte de caja unitaria, posiciones 1-4	Cargue cajas unitarias que contienen cartuchos de preparación de muestras y 8-Rod Covers (consulte el apartado "Material de plástico necesario para 1–4 lotes de muestras" en la página 7)

Cajón "Sample" (muestras)

Tipo de muestra	Plasma humano con EDTA
Volumen de muestra (incluido el volumen sobrante)	1200 µl
Tubos de muestras	Micro tubes 2.0 ml Type H o Micro tubes 2.0 ml Type I (Sarstedt, n.º de referencia 72.693 y 72.694)
Inserto	Tube Insert 3B (n.º de referencia 9242083)

Material de plástico necesario para 1–4 lotes de muestras

Componente	Un lote, 24 muestras*	Dos lotes, 48 muestras*	Tres lotes, 72 muestras*	Cuatro lotes, 96 muestras*
Disposable filter-tips, 200 µl†‡	28	52	76	100
Disposable filter-tips, 1500 µl†‡	113	206	309	402
Sample Prep Cartridges §	21	42	54	72
8-Rod Covers¶	3	6	9	12

* El uso de más de un tubo de control interno por lote y la realización de más de un examen de inventario requieren puntas con filtro desechables adicionales.

† Hay 32 puntas con filtro por gradilla de puntas.

‡ El número de puntas con filtro necesarias incluye las puntas con filtro para 1 examen de inventario por cartucho de reactivos.

§ Hay 28 cartuchos de preparación de muestras por caja unitaria.

¶ Hay doce 8-Rod Covers por caja unitaria.

Configuración del instrumento QIASymphony AS

Consumibles

Durante la configuración, las posiciones adecuadas de cada consumible en el módulo QIASymphony AS aparecen indicadas en la pantalla táctil del instrumento.

Consumible	Nombre que aparece en la pantalla táctil	Para uso con adaptador/soporte para reactivos
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	QIA#981103 *StripTubes 0.1	RG Strip Tubes 72 QS
Tubes, conical, 2 ml, Qsym AS (500) ^{†‡}	QIA#997102 *T2.0 ScrewSkirt [§]	Reagent holder 1 QS
Tubes, conical, 5 ml, Qsym AS (500) ^{†‡}	QIA#997104 *T5.0 ScrewSkirt [§]	Reagent holder 1 QS

* Indica material de laboratorio que se puede refrigerar con un adaptador de refrigeración dotado de código de barras.

[†] Para los componentes de la mezcla maestra, la mezcla maestra preparada por el sistema, los estándares del ensayo y los controles del ensayo.

[‡] También pueden utilizarse los tubos Sarstedt descritos en el apartado "Materiales necesarios pero no suministrados" en la página 3.

[§] El sufijo "(m)" que aparece en la pantalla táctil indica que los cálculos del nivel de líquido del tubo en cuestión se han optimizado para reactivos que forman un menisco cóncavo.

Adaptadores y soportes para reactivos

Gradilla/soporte para reactivos	Nombre	Número necesario [¶]
Soportes para reactivos	Reagent holder 1 QS	1
Gradillas de muestras	RG Strip Tubes 72 QS	1

[¶] Calculado para una serie analítica de ensayo con 72 reacciones.

Puntas con filtro

Cargue las gradillas de puntas comenzando por las ranuras de puntas 1, 2 y 3 en el cajón "Eluate and Reagents" (eluidos y reactivos) y, a continuación, cargue las gradillas de puntas en las ranuras de puntas 7, 8 y 9 en el cajón "Assays" (ensayos).

Consumible	Nombre que aparece en la pantalla táctil	Número mínimo para 24 reacciones	Número mínimo para 72 reacciones
Filter-Tips, 1500 µl (1024)	1500 µl	4	6
Filter-Tips, 200 µl (1024)	200 µl	9	8
Filter-Tips, 50 µl (1024)	50 µl	25	73
Tip Disposal Bags	–	1	1

PCR en el Rotor-Gene Q*

Consulte la hoja de protocolo específica del software *Valores de configuración para procesar artus QS-RGQ Kits* en www.qiagen.com/products/artuscmvpcrkitce.aspx para obtener información sobre el protocolo.

Valores de configuración específicos para el *artus* VZV QS-RGQ Kit

Los valores de configuración específicos con el software 2.1 o superior del Rotor-Gene® se muestran a continuación.

Reaction Volume (Volumen de reacción, µl)	50
Hold (En espera)	Temperatura de choque térmico: 95 grados Tiempo de retención: 10 minutos
Cycling (Ciclado)	45 veces 95 grados durante 15 segundos 65 grados durante 30 segundos (Adquisición en Green, Orange y activación de la función de temperatura decreciente durante 10 ciclos) 72 grados durante 20 segundos
Auto-Gain Optimisation Setup (Configuración de la optimización de ganancia automática)	65 grados (muestras: verde; IC: Orange)

Interpretación de los resultados

En esta sección se describe la interpretación de los resultados obtenidos en el Rotor-Gene Q. Revise asimismo la información sobre el estado de las muestras en los archivos de resultados de los instrumentos QIASymphony SP/AS para el análisis del flujo de trabajo completo desde la muestra hasta el resultado. Solo se deben emplear muestras con un estado válido.

El *artus* VZV QS-RGQ Kit se puede procesar en el Rotor-Gene Q utilizando el análisis manual con el software 2.1 o superior del Rotor-Gene Q. En los siguientes apartados se describe la interpretación de los resultados con el software Rotor-Gene Q, versión 2.1 o superior.

* Si corresponde, instrumento Rotor-Gene Q 5plex HRM con una fecha de producción de enero de 2010 o posterior. La fecha de producción se puede obtener del número de serie situado en la parte posterior del instrumento. El número de serie presenta el formato "mmaannn", donde "mm" indica el mes de producción en dígitos, "aa" indica los dos últimos dígitos del año de producción y "nnn" indica el identificador exclusivo del instrumento.

Detección de la señal y conclusiones

Señal en el canal Cycling Green	Señal en el canal Cycling Orange	Resultado cuantitativo (copias/ml)	Interpretación
Sí	Sí	<12,7	Resultado válido: ADN del VZV detectado, <127 copias/ml. No es posible la cuantificación dado que el resultado cuantitativo se encuentra por debajo del límite de detección. La reproducibilidad del resultado positivo no está asegurada.
Sí	Sí	$\geq 12,7$ y <127	Resultado válido: ADN del VZV detectado, <127 copias/ml. No es posible la cuantificación dado que el resultado cuantitativo se encuentra por debajo del intervalo lineal del ensayo.
Sí	Sí/No*	≥ 127 y $\leq 6,92 \times 10^6$	Resultado válido: ADN del VZV detectado en la concentración calculada. El resultado cuantitativo se encuentra dentro del intervalo lineal del ensayo.
Sí	Sí/No*	$> 6,92 \times 10^6$	Resultado válido: ADN del VZV detectado, $> 6,92 \times 10^6$ copias/ml. No es posible la cuantificación dado que el resultado cuantitativo se encuentra por encima del intervalo lineal del ensayo.†
No	Sí	–	Resultado válido: No hay ADN del VZV detectable. ‡
No	No	–	Resultado no válido: Los resultados no son concluyentes.§

* En este caso, la detección de una señal en el canal Cycling Orange no es imprescindible, ya que las concentraciones altas iniciales de ADN del VZV (señal positiva en el canal Cycling Green) pueden dar lugar a una reducción o a la ausencia de señal de fluorescencia del control interno en el canal Cycling Orange (competición).

† Si se desea una cuantificación, diluya la muestra con plasma sin VZV y repita el procesamiento. Multiplique el resultado cuantitativo de la muestra reprocesada por el factor de dilución.

‡ Si el valor de C_T para el control interno de una muestra negativa es más de 3 ciclos mayor que el valor de C_T para el control interno del control sin molde (No Template Control, NTC) de la serie analítica ($C_{T \text{ IC muestra}} - C_{T \text{ IC NTC}} > 3$), la muestra deberá tratarse como no válida. Los resultados no son concluyentes.

§ Puede encontrar información sobre las fuentes de errores y su solución en el apartado "Guía para la resolución de problemas" del Manual del artus VZV QS-RGQ Kit.

Configuración del umbral para el análisis de PCR

La configuración óptima del umbral para una combinación dada de instrumento Rotor-Gene Q y *artus* QS-RGQ Kit debe establecerse de manera empírica probando las distintas combinaciones, ya que se trata de un valor relativo que depende del flujo de trabajo diagnóstico global. Puede establecerse un valor preliminar de 0,04 para el análisis de la primera serie de PCR. Sin embargo, este valor deberá afinarse en un análisis comparativo de las siguientes series del flujo de trabajo. El umbral debe ajustarse manualmente, justo encima de la señal de fondo de los controles negativos y las muestras negativas. El valor medio del umbral que se obtenga de estos experimentos es el que muy probablemente funcione para la mayoría de las series futuras, pero el usuario deberá revisar a intervalos periódicos el valor umbral generado. Por regla general, el valor umbral oscilará entre 0,03 y 0,05. Este deberá redondearse para no exceder los 3 decimales.

Cuantificación

Los estándares de cuantificación (VZV QS 1-4) del *artus* VZV QS-RGQ Kit se tratan como muestras previamente purificadas y se utiliza el mismo volumen (20 µl). Para generar una curva de estándares con los instrumentos Rotor-Gene Q, los 4 estándares de cuantificación deben utilizarse y definirse en el cuadro de diálogo Edit Samples (Editar muestras) del instrumento Rotor-Gene Q como estándares con las concentraciones especificadas (consulte el manual del usuario del instrumento).

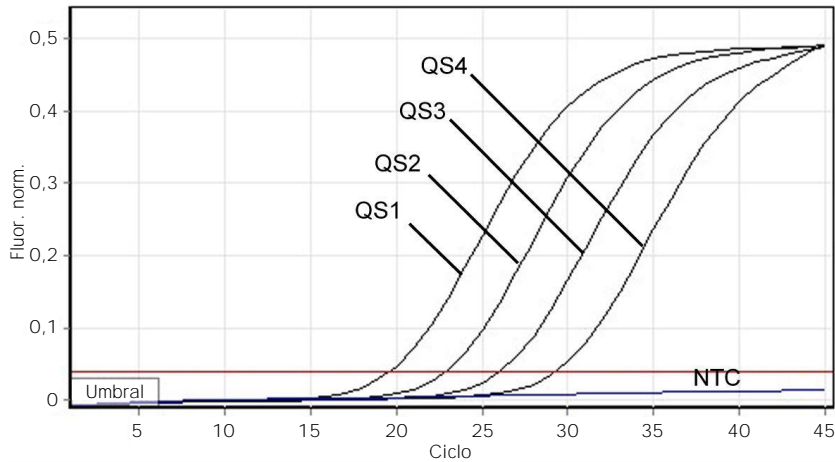
Nota: Los estándares de cuantificación se definen en copias/µl en el eluido. Debe aplicarse la siguiente ecuación para convertir los valores determinados utilizando la curva de estándares en copias/ml de material de muestra:

$$\text{Resultado en el material de muestra (copias/ml)} = \frac{\text{Resultado en el eluido (copias/}\mu\text{l)} \times \text{volumen de elución inicial (90 }\mu\text{l)}^*}{\text{Volumen de muestra (ml)}}$$

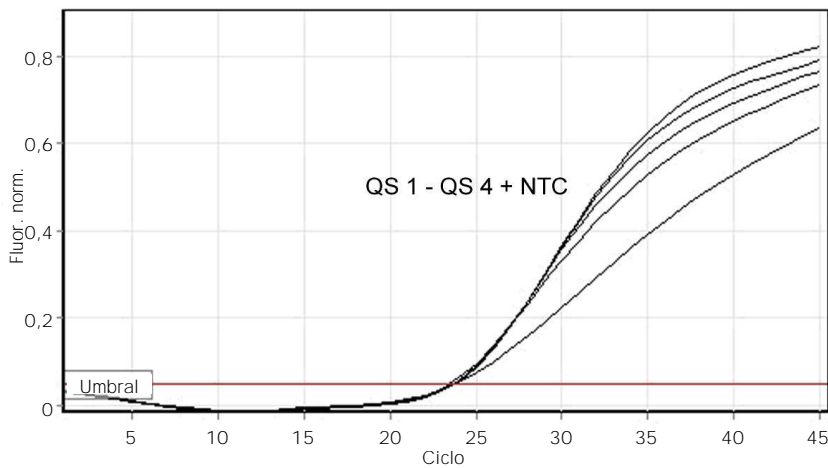
Como norma, debe introducirse en la ecuación anterior el volumen de muestra inicial. Esto debe tenerse en cuenta cuando se ha cambiado el volumen de muestra antes de la extracción de ácidos nucleicos (p. ej., reduciendo el volumen mediante centrifugación o aumentando el volumen mediante adición hasta el volumen necesario para el aislamiento).

* El cálculo se basa en los volúmenes de elución iniciales (90 µl).

Ejemplos de reacciones positivas y negativas de PCR



Detección de los estándares de cuantificación (VZV QS 1-4) en el canal de fluorescencia Cycling Green. NTC: control sin molde (control negativo).



Detección del control interno (Internal Control, IC) en el canal de fluorescencia Cycling Orange con amplificación simultánea de los estándares de cuantificación (VZV QS 1-4). NTC: control sin molde (control negativo).

Historial de revisiones del documento

R2, Abril de 2019 Se eliminó la nota a pie de página relativa a la configuración de 216 ensayos. Se cambió a las nuevas versiones de los protocolos de QIASymphony. Se actualizaron los materiales requeridos para la instalación de un máximo de 72 reacciones. Se añadió información **sobre el uso de la herramienta de QMC "IC Calculator"** (Calculadora de IC). Se actualizó la nomenclatura del material de laboratorio Corning (anteriormente Becton Dickinson). Se añadieron configuraciones específicas de la serie para Rotor-Gene Q (uso de la función de temperatura decreciente, adquisiciones). Se añadió información a la interpretación de los resultados para incluir el caso **"positivo en patógenos y negativo en IC"**. **Se eliminaron** instrucciones sobre el uso de Rotor-Gene AssayManager®; Se cambió el redactado de RT-PCR a PCR para una mayor aclaración; Aclaración de la diferencia entre eluido y concentración de la muestra en el cálculo de cuantificación

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de uso o la guía del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse al servicio técnico de QIAGEN o a su distribuidor local.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, artus®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Group); Corning® (Corning Inc.); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.). Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la legislación.

04/2019 HB0401-S02-002 © 2012-2019 QIAGEN, reservados todos los derechos.

