

Aprile 2019

# Scheda di applicazione

## QIAasymphony<sup>®</sup> RGQ

*artus*<sup>®</sup> BK Virus QS-RGQ Kit  
(tipo di campione: plasma)

R2



4514363

*artus* BK Virus QS-RGQ Kit, versione 1



Prima di eseguire il test verificare la disponibilità di nuove revisioni delle etichette elettroniche nel sito [www.qiagen.com/products/artusbkviruspcrkitce.aspx](http://www.qiagen.com/products/artusbkviruspcrkitce.aspx).

## Informazioni generali

Kit	<i>artus</i> BK Virus QS-RGQ Kit, versione 1 (n. cat. 4514363)
Campioni convalidati	Plasma umano in EDTA
Purificazione front-end	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (n. cat. 937055)
Volume del campione (compreso il volume in eccesso)	1200 µl
Set di parametri del test	<i>artus_BKV_plasma1000_V5</i>
Set di controllo del test predefinito	Cellfree1000_V7_DSP_ <i>artus_BKV</i>
Volume di eluizione	60 µl
Versione del software necessaria	Versione 4.0 o superiore
Volume miscela master	10 µl
Volume del template	15 µl
Numero di reazioni	6-24
Durata esecuzione su modulo AS	Per 6 reazioni: circa 8 minuti Per 72 reazioni: circa 35 minuti

## Materiali necessari ma non in dotazione

### Kit di purificazione

- QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (n. cat. 937055)

### Adattatori per QIASymphony SP

- Elution Microtube Rack QS (Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym, n. cat. 9020730)
- Telaio di trasferimento
- Tube Insert 3B (Insert, 2.0ml v2, samplecarr. (24), Qsym, n. cat. 9242083)

### Materiali di consumo per QIASymphony SP

- Sample Prep Cartridges, 8-well (n. cat. 997002)
- 8-Rod Covers (n. cat. 997004)
- Filter-Tips, 1500 µl (n. cat. 997024)
- Filter-Tips, 200 µl (n. cat. 990332)
- Elution Microtubes CL (n. cat. 19588)
- Tip disposal bags (n. cat. 9013395)
- Micro tubes 2.0 ml Type H o Micro tubes 2.0 ml Type I (Sarstedt®, n. cat. 72.693 e 72.694, [www.sarstedt.com](http://www.sarstedt.com)) **per l'uso con campioni e controlli interni**

### Adattatori e portareagenti per QIASymphony AS

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

### Materiali di consumo per QIASymphony AS

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

## Conservazione e manipolazione dei campioni

Raccolta dei campioni	Campione di sangue 5–10 ml di sangue in EDTA Miscela capovolta per 8 volte — senza agitare! Non utilizzare campioni di sangue umano eparinizzato.
Conservazione dei campioni	Separazione: centrifugazione per 20 minuti, 800–1.600 x g entro 24 ore dal prelievo Trasferimento del plasma isolato in una provetta in polipropilene sterile La sensibilità del test può risultare ridotta se si congelano i campioni di routine o li si conserva per un lungo periodo.
Trasporto dei campioni	Trasporto di materiale fragile Spedizione entro 24 ore Spedizione per posta in conformità alle istruzioni 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 reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR). Non utilizzare campioni raccolti in provette contenenti eparina come anticoagulante o campioni di sangue eparinizzato.
Preparazione dei campioni	<b>Evitare la formazione di schiuma all'interno o sui campioni</b> I campioni devono essere portati a temperatura ambiente (15-25 °C) prima di avviare il test.

\* Associazione del trasporto aereo internazionale (International Air Transport Association, IATA).  
Dangerous Goods Regulations (Regolamenti relativi alle merci pericolose).

# Procedura

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

L'utilizzo dei QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit in combinazione con l'*artus* BK Virus QS-RGQ Kit richiede l'inserimento del controllo interno (BK Virus 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)–Buffer AVE (AVE); il volume totale della miscela controllo interno–carrier RNA (CARRIER)–Buffer AVE (AVE) deve rimanere di 120 µl.

La tabella descrive l'aggiunta del controllo interno all'isolamento nel rapporto di 0,1 µl per 1 µl di volume di eluizione. Si consiglia di preparare miscele fresche per ogni processo subito prima dell'uso.

In alternativa si può usare lo strumento "IC Calculator" (calcolatore controllo interno) nella QIASymphony Management Console.

Componente	Volume (µl) (provette Sarstedt)*	Volume (µl) (provette Corning)†
Soluzione madre con carrier RNA (CARRIER)	5	5
Controllo interno‡	9	9
Buffer AVE	106	106
Volume finale per campione (volume morto escluso)	120	120
Volume totale per n campioni	$(n \times 120) + 360^{\S}$	$(n \times 120) + 600^{\parallel}$

\* Micro tubes 2.0 ml Type H e Micro tubes 2.0 ml Type I, Sarstedt n. cat. 72.693 e 72.694.

† Tubes 14 ml, 17 x 100 mm polystyrene round-bottom (Corning® Inc., n. cat. 352051; Becton Dickinson era il precedente fornitore di queste provette e Corning Inc. è l'attuale fornitore).

‡ Il calcolo della quantità di controllo interno è basato sui volumi di eluizione iniziali (90 µl). Il volume supplementare a vuoto dipende dal tipo di provetta per campione utilizzata.

§ È necessaria una miscela di controllo interno corrispondente a 3 campioni supplementari (ossia 360 µl). Non riempire per un volume totale superiore a 1,92 ml (corrispondente ad un massimo di 13 campioni). Questi volumi sono specifici delle microprovette Micro tubes 2.0 ml Type H e Micro tubes 2.0 ml Type I, Sarstedt n. cat. 72.693 e 72.694).

¶ È necessaria una miscela di controllo interno corrispondente a 5 campioni supplementari (ossia 600 µl). Non riempire per un volume totale superiore a 13,92 ml (corrispondente ad un massimo di 111 campioni). Questi volumi sono specifici per provette Tubes 14 ml, 17 x 100 mm polystyrene round-bottom, Corning Inc., n. cat. 352051; Becton Dickinson era il precedente fornitore di queste provette e Corning Inc. è l'attuale fornitore.

## Setup di QIASymphony SP

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

Supporto per box unitari 1–4	Box unitari vuoti
Supporto per sacchetto dei materiali di scarto	Sacchetto dei materiali di scarto
Supporto per contenitore dei residui liquidi	Svuotare e installare il contenitore dei materiali di scarto liquidi

### Cassetto "Eluate" (Eluito)

Rack per eluizione	Elution Microtubes CL in Elution Microtube Rack QS e telaio di trasferimento  Utilizzare l'apertura 1, posizione di raffreddamento
Volume di eluizione*	Volume di eluizione preselezionato: 60 µl Volume di eluizione iniziale: 90 µl

\* 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 è necessario per garantire che il volume effettivo di eluito sia identico al volume preselezionato.

### Cassetto "Reagents and Consumables" (Reagenti e materiali di consumo)

RC posizioni 1 e 2	Caricare 1 cartuccia reagenti (Reagent Cartridge, RC) per max. 48 campioni o 2 cartucce reagenti (RC) nuove per max. 96 campioni
Supporto per rack per puntali posizioni 1-18	Caricare un sufficiente numero di rack per puntali con filtro monouso, 200 µl e 1500 µl ( <b>vedere</b> "Plastica da laboratorio necessaria per lotti da 1-4 campioni", pag. 7)
Supporto per box unitari posizioni 1-4	Caricare box unitari contenenti cartucce per la preparazione dei campioni e 8-Rod Covers ( <b>vedere</b> "Plastica da laboratorio necessaria per lotti da 1-4 campioni", pag. 7)

## Cassetto "Sample" (Campione)

Tipo di campione	Plasma umano in EDTA
Volume del campione (compreso il volume in eccesso)	1200 µl
Provette per campioni	Micro tubes 2.0 ml Type H o Micro tubes 2.0 ml Type I (Sarstedt, n. cat. 72.693 e 72.694)
Inserto	Tube Insert 3B (n. cat. 9242083)

Plastica da laboratorio necessaria per lotti da 1-4 campioni

Componente	Un lotto, 24 campioni*	Due lotti, 48 campioni*	Tre lotti, 72 campioni*	Quattro lotti, 96 campioni*
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

\* L'impiego di più di una provetta di controllo interno per lotto e l'esecuzione di più di una scansione di inventario richiedono ulteriori puntali con filtro monouso.

† Ci sono 32 puntali con filtro su ogni rack per puntali.

‡ La quantità di puntali con filtro necessari include i puntali con filtro per 1 scansione di inventario per ogni cartuccia reagenti.

§ Ci sono 28 cartucce per la preparazione dei campioni in ogni box unitario.

¶ Ci sono dodici 8-Rod Covers in ogni box unitario.

## Setup di QIASymphony AS

### Materiali di consumo

Durante il setup, le rispettive posizioni di ogni materiale di consumo sul modulo QIASymphony AS sono indicate sul touch screen dello strumento.

Materiale di consumo	Nome sul touch screen	Da utilizzare con adattatore/ portareagenti
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) <sup>†‡</sup>	QIA#997102 *T2.0 ScrewSkirt <sup>§</sup>	Reagent holder 1 QS
Tubes, conical, 5 ml, Qsym AS (500) <sup>†‡</sup>	QIA#997104 *T5.0 ScrewSkirt <sup>§</sup>	Reagent holder 1 QS

\* Indica il materiale da laboratorio che può essere raffreddato utilizzando un adattatore di raffreddamento con codice a barre.

<sup>†</sup> Per componenti della miscela master, miscela master preparata dal sistema, standard del test e controlli del test.

<sup>‡</sup> In alternativa, si possono usare le provette Sarstedt descritte in "Materiali necessari ma non in dotazione", pag. 3.

<sup>§</sup> 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 necessario <sup>¶</sup>
Portareagenti	Reagent holder 1 QS	1
Rack per campioni	RG Strip Tubes 72 QS	1

<sup>¶</sup> Calcolato per un processo di 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 negli slot 7, 8 e 9 del cassetto "Assays" (Test).

Materiale di consumo	Nome sul touch screen	Numero minimo per 24 reazioni	Numero minimo per 72 reazioni
Filter-Tips, 1500 µl (1024)	1500 µl	3	4
Filter-Tips, 200 µl (1024)	200 µl	5	5
Filter-Tips, 50 µl (1024)	50 µl	25	73
Tip Disposal Bags	–	1	1



## PCR sul Rotor-Gene Q\*

Consultare la scheda di protocollo specifica del software *Impostazioni per eseguire gli artus QS-RGQ Kit* disponibile all'indirizzo [www.qiagen.com/products/artusbkviruspcrkitce.aspx](http://www.qiagen.com/products/artusbkviruspcrkitce.aspx) per i dettagli del protocollo.

### Impostazioni specifiche per l'artus BK Virus QS-RGQ Kit

Con il software Rotor-Gene® Q 2.1 o versioni superiori, le impostazioni specifiche sono descritte qui di seguito.

Reaction Volume (Volume di reazione) (µl)	50 Anche se il volume fisico di reazione è di 25 µl, <b>selezionare comunque 50</b> per il volume di reazione nel software Rotor-Gene Q.
Hold (Mantenimento)	Temperatura di mantenimento: 95 gradi Durata di mantenimento: 10 minuti
Cycling (Ciclo)	45 volte 95 gradi per 15 secondi 65 gradi per 30 secondi (acquisire su Green, Orange, e attivare la funzione di touchdown per 10 cicli) 72 gradi per 20 secondi
Auto-Gain Optimisation Setup (Configurazione ottimizzazione guadagno automatico)	65 gradi (Campioni: Green; IC: Orange)

### Interpretazione dei risultati

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

L'artus BK Virus QS-RGQ Kit può essere eseguito sul Rotor-Gene Q utilizzando l'analisi manuale con il software Rotor-Gene Q 2.1 o versione superiore. Le sezioni che seguono descrivono l'interpretazione dei risultati utilizzando il software Rotor-Gene Q 2.1 o versione superiore.

\* Utilizzare possibilmente uno strumento Rotor-Gene Q 5plex HRM con data di produzione gennaio 2010 o successiva. La data di produzione può essere ricavata dal numero di serie sul retro dello strumento. Il numero di serie è nel formato "mmaann", dove "mm" indica il mese di produzione in cifre, "aa" indica le ultime due cifre dell'anno di produzione e "nnn" indica l'ID univoco dello strumento.

## Rilevamento dei segnali e conclusioni

Segnale nel canale Cycling Green	Segnale nel canale Cycling Orange	Risultato quantitativo (copie/ml)	Interpretazione
Si	Si	<26,7	Risultato valido: DNA del BK rilevato, <50 copie/ml. È impossibile eseguire una quantificazione poiché il risultato quantitativo è inferiore al limite di rilevabilità. La riproducibilità del risultato positivo non è garantita.
Si	Si	≥26,7 e <50	Risultato valido: DNA del BK rilevato, <50 copie/ml. È impossibile eseguire una quantificazione poiché il risultato quantitativo è inferiore al range lineare del test.
Si	Si/No*	≥50 e ≤9,3 x 10 <sup>7</sup>	Risultato valido: DNA del BK rilevato alla concentrazione calcolata. Il risultato quantitativo rientra nel range lineare del test.
Si	Si/No*	>9,3 x 10 <sup>7</sup>	Risultato valido: DNA del virus BK rilevato, >9,3 x 10 <sup>7</sup> copie/ml. È impossibile eseguire una quantificazione poiché il risultato quantitativo è superiore al range lineare del test.†
No	Si	–	Risultato valido: Non è rilevabile DNA del virus BK.‡
No	No	–	Risultato non valido: Non si può trarre alcun risultato.§

\* In questo caso, la rilevazione di un segnale nel canale Cycling Orange è trascurabile, dal momento che alte concentrazioni iniziali di DNA di virus BK (segnale positivo nel canale Cycling Green) possono dare origine a un segnale di fluorescenza ridotto o assente nel canale Cycling Orange del controllo interno (fenomeno di competizione).

† Se si desidera effettuare una quantificazione, diluire il campione con plasma privo del virus BK e ripetere l'analisi. Moltiplicare il risultato quantitativo del campione rianalizzato per il fattore di diluizione.

‡ Se il valore C<sub>T</sub> per il controllo interno di un campione negativo è superiore di più di 3 cicli al valore C<sub>T</sub> per il controllo interno del controllo no template nel processo (C<sub>T</sub> IC Campione – C<sub>T</sub> IC NTC >3), il campione va considerato come non valido. Non si può trarre alcun risultato.

§ Si possono trovare informazioni sulle cause d'errore e relative soluzioni nella "Guida alla risoluzione dei problemi" del manuale dell'artus BK Virus QS-RGQ Kit.

## Impostazione della soglia per l'analisi della reazione a catena della polimerasi (PCR)

Le impostazioni ottimali di soglia per una data combinazione dello strumento Rotor-Gene Q e dell'*artus* QS-RGQ Kit 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 a un valore preliminare di 0,04 per l'analisi della prima 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 background 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 a intervalli regolari. Il valore di soglia sarà normalmente compreso nel range 0,03–0,05 e dovrà essere arrotondato a non più di tre cifre decimali.

## Quantificazione

Gli standard di quantificazione (BK Virus QS 1–4) nell'*artus* BK Virus QS-RGQ Kit sono trattati come campioni precedentemente purificati e si usa lo stesso volume (15 µl). Per generare una curva standard sugli strumenti Rotor-Gene Q, tutti e 4 gli standard quantitativi 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).

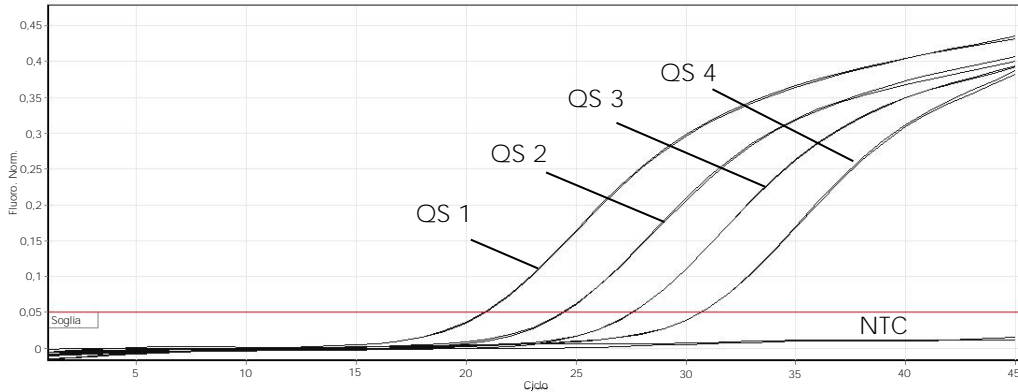
Nota: gli standard quantitativi sono definiti come copie/µl nell'eluato. Si deve applicare la seguente equazione per convertire i valori, determinati mediante la curva standard, in copie/ml di campione.

$$\text{Risultato nel materiale} \\ \text{campione (copie/ml)} = \frac{\text{Risultato nell'eluato (copie/}\mu\text{l)} \times \text{volume di eluizione} \\ \text{iniziale (90 }\mu\text{l)}^*}{\text{Volume campione (ml)}}$$

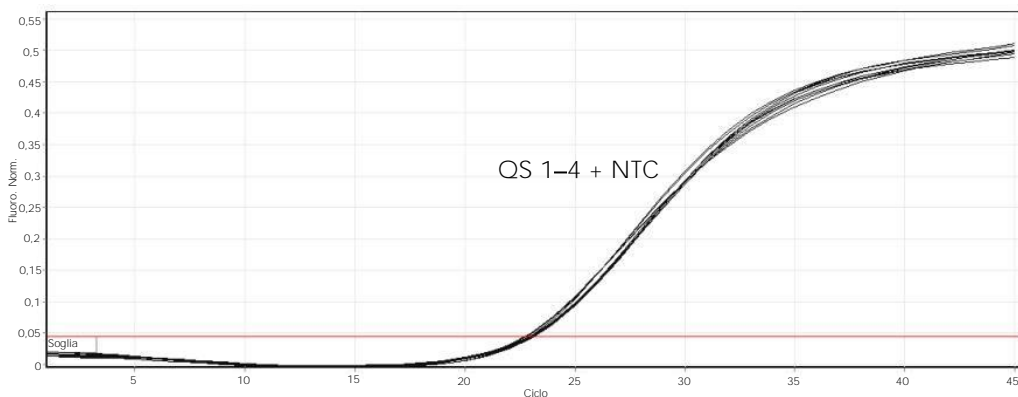
In linea di principio, si deve immettere nell'equazione di cui sopra il volume iniziale del campione. Occorre tenere conto di ciò quando il volume del campione è stato cambiato prima dell'estrazione dell'acido nucleico (per es., riducendo il volume mediante centrifugazione o aumentandolo con l'aggiunta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

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

## Esempi di reazioni PCR positive e negative



Rilevazione degli standard di quantificazione (BK Virus QS 1-4) nel canale di fluorescenza Cycling Green. NTC: No Template Control (controllo no template) (controllo negativo).



Rilevazione del controllo interno (Internal Control, IC) nel canale di fluorescenza Cycling Orange con amplificazione contemporanea degli standard di quantificazione (BK Virus QS 1-4). NTC: No Template Control (controllo no template) (controllo negativo).

#### Cronologia delle revisioni del documento

R2, aprile 2019      Rimossa la nota a piè di pagina relativa alla configurazione di 216 test. Cambiato con le nuove versioni dei protocolli QIASymphony. Aggiornati i materiali richiesti per la configurazione di 72 reazioni al massimo. Aggiunte informazioni sull'utilizzo dello strumento "IC Calculator" (calcolatore controllo interno) della QIASymphony Management Console (QMC). Aggiornata la denominazione di Corning Labware (prima Becton Dickinson). Aggiunte le impostazioni specifiche per l'esecuzione di Rotor-Gene Q (volume, uso della funzione di touchdown, acquisizioni). Aggiunte informazioni all'interpretazione dei risultati per includere il caso "patogeno positivo e controllo interno negativo". Rimosse le istruzioni per l'uso di Rotor-Gene AssayManager®; modificata la denominazione da RT-PCR a PCR per maggior chiarezza; chiarimento della differenza tra eluito e concentrazione del campione nel calcolo della quantificazione

Per le informazioni aggiornate sulla licenza e le clausole di esclusione della responsabilità per i singoli prodotti, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN specifico. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza QIAGEN o al distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, artus®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (Gruppo QIAGEN); Corning® (Corning Inc.); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.). I marchi registrati, i marchi di fabbrica ecc. utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, non possono essere considerati non protetti dalla legge.  
04/2019 HB-0399-S01-002 © 2012–2019 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

