

Agosto 2018

Manual do QIAamp[®] DSP Virus Kit



O QIAamp DSP Virus Kit é um sistema genérico que utiliza a tecnologia QIAamp para realizar o isolamento e purificação de ácidos nucleicos virais de amostras de plasma ou soro humanos para procedimentos de diagnóstico in vitro.

Para utilização em diagnóstico in vitro

IVD

CE

REF

60704

i

1114514PT

QIAGEN

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R3 MAT

1114514PT

Índice

Conteúdo do kit.....	3
Símbolos	4
Armazenamento	6
Controlo da qualidade	6
Utilização prevista	7
Limitações de utilização do produto.....	8
Avisos e precauções	8
Introdução	11
Princípio e procedimento.....	11
Caraterísticas de desempenho	12
Equipamento e reagentes a serem providenciados pelo utilizador	18
Notas importantes	19
Pontos importantes antes de iniciar o procedimento.....	19
Preparar o ARN	20
Armazenamento de amostras.....	21
Preparação de reagentes e tampões.....	21
Eluição de ácidos nucleicos virais	25
Rendimento e qualidade dos ácidos nucleicos virais.....	26
Montagem do sistema de vácuo QIAvac 24 Plus	27
Protocolo: Isolamento e purificação de ácidos nucleicos virais de plasma e soro.....	30
Histórico de revisões	34

Conteúdo do kit

QIAamp DSP Virus Kit			
N.º de catálogo			60704
Número de preparações			50
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (Colunas QIAamp MinElute® com tubos de lavagem) (WT) (2 ml)	COL	50
EXT	Column Extenders (Extensores da coluna) (3 ml)	COL EXT	50
ET	Elution Tubes (Tubos de eluição) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors (Conectores de vácuo)	VAC CON	50
LT	Lysis Tubes (Tubos de lise) (2 ml)	LYS TUBE	50
WT	Wash Tubes (Tubos de lavagem) (2 ml)	WASH TUBE	50
AL	Lysis Buffer* (Tampão de lise)	LYS BUF	33 ml
AW1	Wash Buffer 1* (Tampão de lavagem 1) (concentrado)	WASH BUF 1 CON	19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (Tampão de lavagem 2) (concentrado)	WASH BUF 2 CON	13 ml
AVE	Elution Buffer† (Tampão de eluição) (tampas roxas)	ELU BUF	4 x 2 ml
PS	Protease Solvent† (Solvente de protease)	QPROT SOLV	4,4 ml
Carrier	Carrier RNA (ARN transportador) (tampas vermelhas)	CAR RNA	310
QP	QIAGEN® Protease (Protease QIAGEN®)	QPROT	1 frasco

* Contém hidrócloro de guanidina. Não compatível com desinfetantes que contenham lixívia. Consultar informações de segurança na página 8.

† Contém azida de sódio como conservante.

‡ Volume de ressuspensão 4,4 ml.

Símbolos



Kit com reagentes para a preparação de 50 amostras



Consultar a informação facultada no manual



Para ser utilizado por

IVD

Dispositivo médico de diagnóstico in vitro

REF

Número de catálogo

LOT

Número de lote

MAT

Número do material

COMP

Componentes

VOL

Volume



Limites de temperatura

Após a entrega



Fabricante legal



Nota importante



Mudar de luvas depois de cada passo do protocolo com este símbolo



Abrir no momento da entrega; conservar as colunas para centrifugação do QIAamp Mini a 2–8 °C

GTIN

Número global de item comercial



Anotar a data atual depois de adicionar etanol ao frasco

ADD

Adicionar

CONT

Conteúdo

LYOPH

Liofilizado

RCNS

Reconstituído em

EtOH

Etanol

GuHCl

Hidrocloreto de guanidina

MALEIC ACID

Ácido maleico

SUBT

Subtilisina



Resulta em

Armazenamento

As colunas QIAamp MinElute devem ser conservadas a 2–8 °C após a entrega.

Todos os tampões podem ser conservados à temperatura ambiente (15–25 °C).

O ARN transportador liofilizado pode ser armazenado à temperatura ambiente até ao fim do prazo de validade. O ARN transportador só pode ser dissolvido em tampão de eluição (AVE); o ARN transportador dissolvido deve ser adicionado imediatamente ao tampão de lise (AL), tal como descrito na página 21. Esta solução deve ser preparada na hora, mantendo-se estável a 2–8 °C durante até 48 horas. As porções de ARN transportador não usadas dissolvidas em tampão de eluição (AVE) devem ser congeladas em alíquotas a –20 °C.

A protease QIAGEN (QP) liofilizada pode ser armazenada à temperatura ambiente até ao fim do prazo de validade sem afetar negativamente o desempenho.

A protease QIAGEN (QP) reconstituída mantém-se estável até 1 ano, desde que seja armazenada entre 2–8 °C, mas só até ao fim do prazo de validade.

O tampão de lavagem 1 (AW1) reconstituído e o tampão de lavagem 2 (AW2) reconstituído permanecem estáveis até 1 ano quando armazenados à temperatura ambiente, mas só até ao fim do prazo de validade.

Controlo da qualidade

De acordo com o Sistema da Certificação da Qualidade Total da QIAGEN, cada lote do QIAamp DSP Virus Kit é testado face a especificações predeterminadas para garantir uma qualidade constante do produto.

Utilização prevista

O QIAamp DSP Virus Kit é um sistema genérico que utiliza a tecnologia QIAamp para realizar o isolamento e purificação de ácidos nucleicos virais de amostras de plasma ou soro humanos para fins de diagnóstico *in vitro*. Qualquer resultado de diagnóstico proveniente da utilização do procedimento de preparação da amostra conjuntamente com qualquer ensaio de diagnóstico NAT a jusante, deve ser interpretado tendo também em consideração qualquer outro dado clínico ou de laboratório relacionado.

Este produto deve ser utilizado unicamente por profissionais, como, por exemplo, técnicos e médicos com formação nas técnicas de biologia molecular. Foi concebido para ser utilizado com qualquer aplicação a jusante utilizando a amplificação enzimática ou outra modificação do ADN ou ARN, seguida por deteção ou amplificação do sinal. Os ácidos nucleicos virais isolados e purificados podem ser utilizados em ensaios NAT de diagnóstico qualitativo (por exemplo, rastreio do sangue) e quantitativo (por exemplo, monitorização da carga viral).

Para minimizar irregularidades nos resultados de diagnóstico, o produto destina-se a ser utilizado com um controlo interno assim como com controlos positivos e negativos durante o processo de preparação de amostras, assim como amplificação e deteção de amostras de acordo com o ensaio a jusante utilizado.

O produto foi concebido para utilização com o sistema de vácuo QIAvac 24 Plus ou com um sistema de vácuo equivalente.

Limitações de utilização do produto

O kit não se destina a ser utilizado com sangue, tecidos, medula óssea ou culturas de células. O kit também não se destina a ser utilizado para o isolamento e purificação de ácidos nucleicos de bactérias, fungos ou parasitas. O desempenho do kit no isolamento e purificação de ácidos nucleicos virais de outros fluidos corporais isentos de células, como a urina e o LCR, não foi avaliado.

Avisos e precauções

Ao trabalhar com substâncias químicas, utilizar sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (FDS) apropriadas. Estas estão disponíveis online no formato PDF, prático e compacto, no endereço www.qiagen.com/safety, onde é possível encontrar, visualizar e imprimir as fichas de dados de segurança para cada kit QIAGEN e respetivos componentes.

PRECAUÇÃO: Não adicionar lixívia nem soluções ácidas aos resíduos provenientes da preparação de amostras.

O tampão de lise (AL) e o tampão de lavagem 1 (AW1) contêm hidrócloro de guanidina, que pode formar compostos altamente reativos quando misturado com lixívia. Em caso de derrame de algum líquido contendo os tampões referidos, limpar com detergentes apropriados para utilização em laboratório e água. Se o líquido derramado contiver agentes potencialmente infecciosos, limpar a área afetada primeiramente com detergente apropriado para utilização em laboratório e água e, depois, com 1% (v/v) de solução de hipoclorito de sódio.

Se os frascos do tampão estiverem danificados ou apresentarem fugas, utilizar luvas e óculos de proteção ao descartar os frascos para evitar acidentes pessoais ou lesões em terceiros.

A QIAGEN não testou os resíduos líquidos gerados pelo procedimento QIAamp DSP Virus quanto à presença de materiais infecciosos residuais. Consequentemente, devem ser empregues precauções universais (luvas, batas de laboratório e proteção ocular) para manusear material de origem humana potencialmente infeccioso ao trabalhar com este produto, e os resíduos líquidos têm de ser considerados infecciosos e têm de ser manuseados e eliminados de acordo com os regulamentos de segurança locais.

As frases de perigo e precaução que se seguem aplicam-se aos componentes do QIAamp DSP Virus Kit.

Tampão AL



Contém: hidrocloreto de guanidina; ácido maleico. Aviso! Pode ser nocivo por ingestão ou inalação. Provoca irritação cutânea. Pode provocar uma reação alérgica cutânea. Provoca irritação ocular grave. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Tampão AW1



Contém: hidrocloreto de guanidina. Aviso! Nocivo por ingestão ou inalação. Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Protease QIAGEN



Contém subtilisina. Perigo! Nocivo por ingestão. Provoca irritação cutânea. Provoca lesões oculares graves. Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias. Pode provocar irritação das vias respiratórias. Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Usar proteção respiratória. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Contactar imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração.

Introdução

O QIAamp DSP Virus Kit utiliza uma tecnologia bem estabelecida para o isolamento e purificação simultâneos de ADN e ARN viral. O procedimento QIAamp DSP Virus combina as propriedades de ligação seletiva de uma membrana à base de sílica com volumes mínimos de eluição de 20 ou 60 µl.

O procedimento é indicado para a utilização com plasma ou soro; ambos podem conter citrato ou EDTA. As amostras podem ser recém-colhidas, liofilizadas ou congeladas, desde que não tenham sido congeladas e descongeladas mais de uma vez. O procedimento pode ser utilizado para o isolamento de ARN e ADN virais de uma vasta gama de vírus de ADN e ARN. O procedimento foi concebido para evitar a contaminação cruzada de amostra para amostra e permitir a manipulação segura de amostras potencialmente infecciosas. O procedimento é muito adequado para o processamento simultâneo de várias amostras. Os ácidos nucleicos virais são eluídos em tampão de eluição (AVE), prontos para utilização em reações de amplificação ou armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Princípio e procedimento

O procedimento QIAamp DSP Virus é composto por 4 passos:

- Lise das partículas do vírus na amostra
- Ligação dos ácidos nucleicos virais no lisado à membrana de uma coluna QIAamp MinElute
- Lavagem da membrana
- Eluição dos ácidos nucleicos virais da membrana

O procedimento é levado a cabo utilizando colunas QIAamp MinElute num coletor de vácuo.

Lise das partículas do vírus

As células são lisadas sob condições de desnaturação a temperaturas elevadas. A lise é realizada na presença de protease QIAGEN (QP) e tampão de lise (AL), que, em conjunto, garantem a inativação de RNases.

Ligação de ácidos nucleicos à membrana da coluna QIAamp MinElute

Para otimizar a ligação do ADN e do ARN viral à membrana da coluna QIAamp MinElute, primeiramente adiciona-se etanol aos lisados. Cada lisado é, então, aplicado numa coluna QIAamp MinElute e os ácidos nucleicos virais são adsorvidos para a membrana de gel de sílica à medida que o lisado é escoado por aplicação de vácuo.

Remoção de contaminantes residuais

Enquanto os ácidos nucleicos virais permanecem ligados à membrana da coluna QIAamp MinElute, os contaminantes são arrastados por lavagem utilizando primeiro o tampão de lavagem 1 (AW1), depois o tampão de lavagem 2 (AW2) e depois etanol.

Eluição de ácidos nucleicos puros

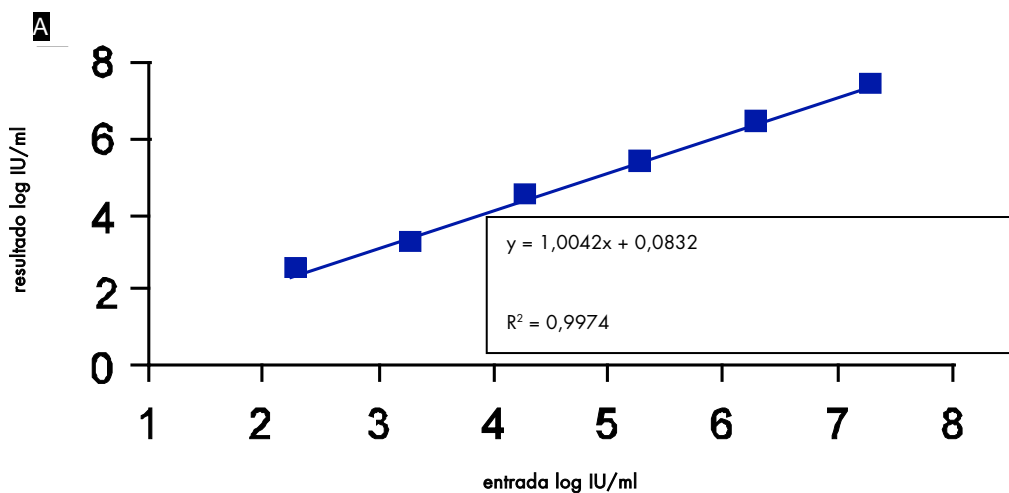
Os ácidos nucleicos virais são eluídos da membrana da coluna QIAamp MinElute com a utilização de tampão de eluição (AVE). As colunas QIAamp MinElute permitem volumes de eluição de 20 µl ou 60 µl.

Caraterísticas de desempenho

O intervalo linear do procedimento QIAamp DSP Virus foi determinado para o ARN do VIH e o ADN do VHB em vários ensaios de diagnóstico a jusante (Tabela 1, Figura 1 e Figura 2).

Tabela 1.-Ensaio de diagnóstico a jusante nos quais o intervalo linear do procedimento QIAamp DSP Virus foi testado

Ensaio	Kit
RT-PCR em tempo real do ARN do VIH	TaqMan® Assay e COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR® Test
PCR em tempo real do ADN do VHB	TaqMan Assay e cobas AMPLICOR HBV MONITOR® Test



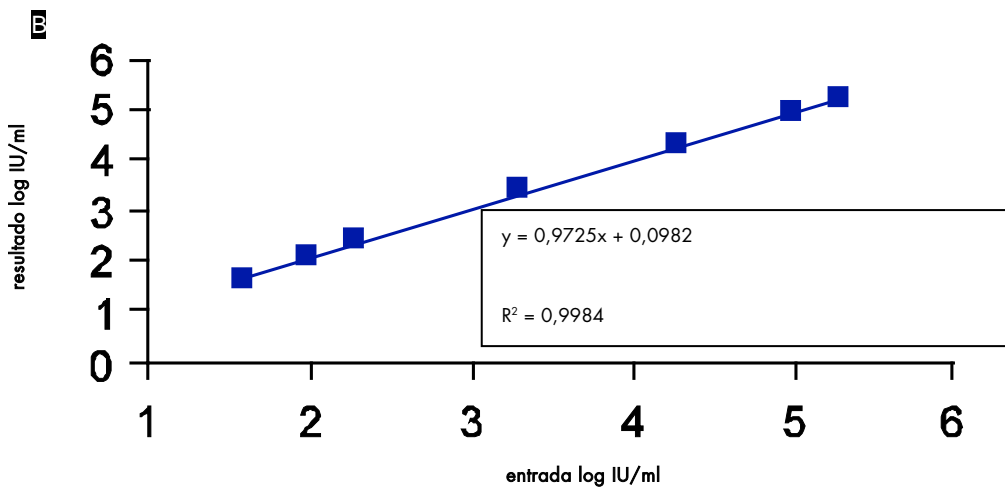


Figura 1. Intervalo linear do procedimento QIAamp DSP Virus utilizando TaqMan Assays. O intervalo linear do procedimento QIAamp DSP Virus com um volume de eluição de 60 µl foi determinado utilizando TaqMan Assays para **A** ARN do VIH e **B** ADN do VHB.

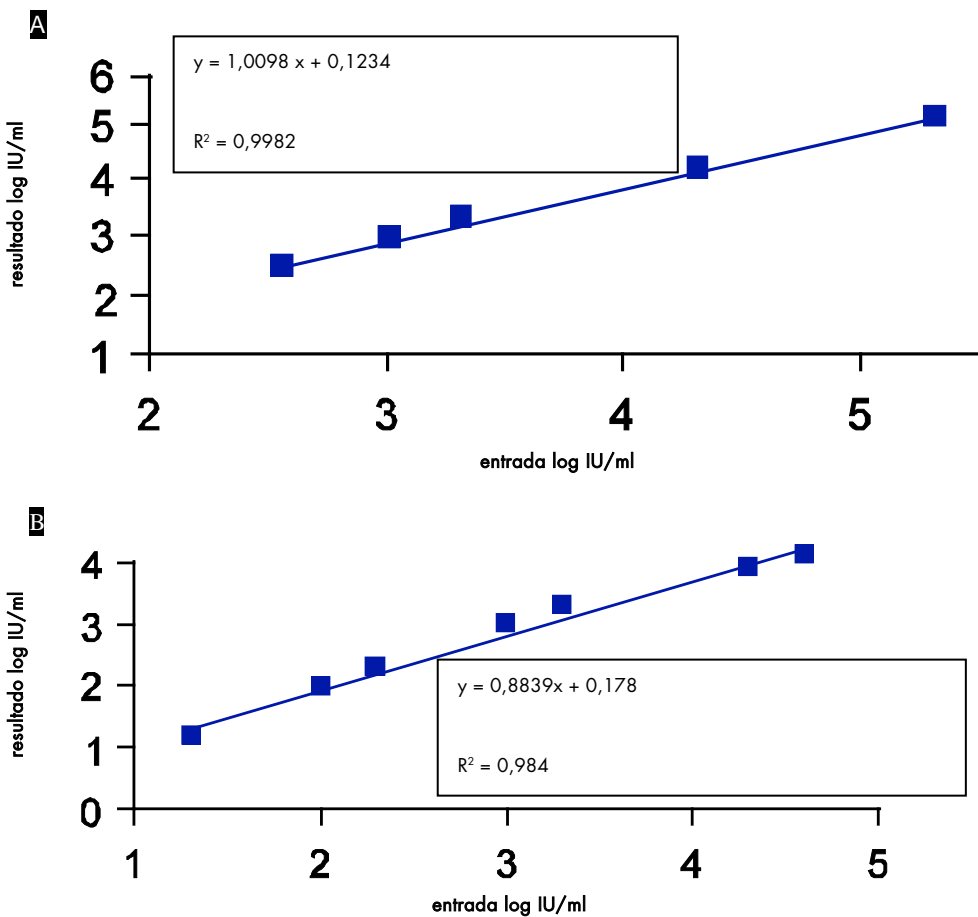


Figura 2. Intervalo linear do procedimento QIAamp DSP Virus utilizando cobas AMPLICOR MONITOR Tests. O intervalo linear do procedimento QIAamp DSP Virus com um volume de eluição de 60 µl foi determinado utilizando cobas AMPLICOR MONITOR Tests para **A** ARN do VIH e **B** ADN do VHB.

O limite de detecção (detection limit, DL) e o limite de quantificação (quantification limit, QL), de acordo com as diretrizes da ICH 2QA e 2QB, foram determinados para o procedimento QIAamp DSP Virus (com um volume inicial da amostra de 500 µl e volumes de eluição de 20 µl e 60 µl) utilizando diversos ensaios de diagnóstico a jusante (Tabela 2 e Tabela 3).

Tabela 2.-Limite de detecção do procedimento QIAamp DSP Virus

Ensaio	Volume de eluição	Cut off de 95%
<i>artus</i> [®] RealArt™ HBV DNA	20 µl	2,31 IU/ml (n=240)
<i>artus</i> RealArt HCV RNA	20 µl	24,31 IU/ml (n=192)
AMPLICOR manual HIV RNA	60 µl	90,92 IU/ml (n=209)
TaqMan HBV DNA	60 µl	4,73 IU/ml (n=192)

Tabela 3.-Limite de quantificação do procedimento QIAamp DSP Virus

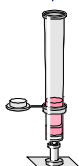
Ensaio	QL	CV
TaqMan HBV DNA	5,7 IU/ml	< 70% (n=88)
TaqMan HIV RNA	52 IU/ml	< 60% (n=88)
cobas AMPLICOR HIV RNA	100 IU/ml	< 60% (n=88)
cobas AMPLICOR HBV DNA	30 IU/ml	< 60% (n=88)
cobas AMPLICOR HCV RNA [®]	700 IU/ml	< 60% (n=66)

Procedimento QIAamp DSP Virus

Amostra



Lise



Ligaçã

Vácuo



La vagem
(AW1)

Retirar a EXT
antes de
aplicar vácuo

Vácuo



La vagem
(AW2)

Vácuo



La vagem
(etanol)

Vácuo



Rotaçã o a
seco

Eluiçã o



Ácidos nucleicos virais
puros

Ler o protocolo (página 30) com atenção antes de começar.

No LT, adicionar 75 µl de QP, 500 µl de amostra e 500 µl de AL.

Agitar com vórtex durante 15 segundos.

Incubar 15 minutos (\pm 1 minuto) a 56 °C (\pm 1 °C).

Adicionar 600 µl de etanol.

Agitar com vórtex durante 15 segundos.

Incubar 5 minutos (\pm 1 minuto) à temperatura ambiente (15–25 °C).

Transferir o lisado para a coluna QIAamp MinElute com a EXT fornecida.

Adicionar 600 µl de AW1 reconstituído.

Remove EXT.

Adicionar 700 µl de AW2 reconstituído.

Adicionar 750 µl de etanol.

Colocar a coluna QIAamp MinElute em WT.

Centrifugar 1 minuto a 14 000 rpm.

Colocar a coluna QIAamp MinElute em WT.

Incubar 3 minutos a 56 °C.

Colocar a coluna QIAamp MinElute em ET.

Adicionar 20 µl ou 60 µl de AVE.

Incubar 3 minutos à temperatura ambiente.

Centrifugar 1 minuto a 14 000 rpm.

Equipamento e reagentes a serem providenciados pelo utilizador

Ao trabalhar com substâncias químicas, utilizar sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (FDS) apropriadas, disponíveis junto do fornecedor do produto.

- Etanol (96–100%)
- Pipetas* e pontas de pipeta (para evitar contaminação cruzada, recomendamos vivamente o uso de pontas de pipeta com barreiras para aerossóis)
- Luvas descartáveis
- Bloco de aquecimento* para a lise das amostras a 56 °C (recomenda-se o sistema termoaagitador Eppendorf® Thermomixer comfort com bloco térmico para microtubos de teste de 2,0 ml[†])
- Microcentrífuga*
- Cilindro graduado (50 ml)
- Misturador de vórtice
- O sistema de vácuo QIAvac 24 Plus (QIAvac 24 Plus, n.º de cat. 19413, QIAvac Connecting System, n.º de cat. 19419 e Vacuum Pump, n.º de cat. 84020[†]), ou qualquer sistema de vácuo geral equivalente para laboratório


* Para garantir que as amostras são devidamente processadas no procedimento QIAamp DSP Virus, recomendamos vivamente que os instrumentos (por ex., pipetas e blocos de aquecimento) sejam calibrados segundo as recomendações do fabricante.

[†] Não se trata de uma lista completa de fornecedores nem inclui muitos distribuidores importantes de produtos biológicos.

[†] O n.º de cat. 84020 corresponde a uma bomba adequada para países europeus (por ex., Alemanha). Para países que tenham outros requisitos de tensão ou fichas, contactar a Assistência Técnica da QIAGEN.

Notas importantes

Pontos importantes antes de iniciar o procedimento

- Após a receção do kit, verificar todos os componentes do mesmo quanto a danos. Se as embalagens de blister ou os frascos de tampão apresentarem danos, contactar a Assistência Técnica da QIAGEN ou o distribuidor local. Em caso de derrame de líquido, consultar “Avisos e precauções” (página 8).
- Não utilizar os componentes do kit que estejam danificados, já que sua utilização pode ocasionar um funcionamento deficiente do mesmo.
- Utilizar sempre equipamento isento de RNase.
- Conservar o etanol (96–100%) em gelo durante o procedimento.
- Mudar sempre as pontas das pipetas entre cada transferência de líquidos. Para evitar a contaminação cruzada, recomenda-se a utilização de pontas de pipetas com barreira para aerossóis.
- Realizar todos os passos correspondentes à centrifugação à temperatura ambiente (15–25 °C).
- Utilizar sempre luvas descartáveis e assegurar regularmente que não estão contaminadas com material proveniente da amostra.
- Descartar as luvas se ficarem contaminadas e, pelo menos, em todos os passos nos quais é apresentado um símbolo com a forma de uma luva. 
- Evitar a contaminação cruzada abrindo só um tubo de cada vez.
- Não utilizar componentes de outros kits com o kit que está a ser utilizado em determinado momento, exceto quando tiverem números de lote iguais.
- Evitar a contaminação microbiana dos reagentes do kit.
- Para assegurar a segurança de materiais potencialmente infecciosos, recomenda-se trabalhar num ambiente de fluxo de ar laminar até as amostras serem lisadas.

- Este kit apenas deve ser utilizado por pessoal com formação em práticas de diagnóstico in vitro.
- O procedimento fornece instruções para o processamento de uma única amostra de plasma ou soro. No entanto, podem ser processadas até 24 amostras ao mesmo tempo com o sistema de vácuo QIAvac 24 Plus.

Preparar o ARN

Ao preparar ARN viral, trabalhar rapidamente durante os passos manuais do procedimento.

O tampão de eluição (AVE) contém azida de sódio*, um agente antimicrobiano que impede o crescimento de organismos produtores de RNase. No entanto, como este tampão não contém quaisquer químicos de degradação da RNase, não irá inibir ativamente RNases introduzidas por um manuseamento incorreto. É necessário ter extremo cuidado para evitar a contaminação com RNases durante o manuseamento do tampão de eluição (AVE).

* Ao trabalhar com substâncias químicas, utilizar sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção.

Armazenamento de amostras

Depois da colheita e da centrifugação, o plasma ou o soro podem ser armazenados a 2–8 °C durante até 6 horas. Para períodos de armazenamento de longa duração, recomenda-se o congelamento a –20 °C ou –80 °C em alíquotas. As amostras congeladas de plasma ou soro não podem ser descongeladas mais de uma vez. Os congelamentos e os descongelamentos repetidos provocam a desnaturação e a precipitação de proteínas, resultando em títulos virais reduzidos e, assim, em rendimentos reduzidos de ácidos nucleicos virais. Além disso, os crioprecipitados formados durante o congelamento e o descongelamento irão obstruir a membrana da coluna QIAamp MinElute. Se forem visíveis crioprecipitados, estes devem ser peletizados por centrifugação a cerca de 6800 x g, durante 3 minutos. O sobrenadante clarificado deve ser aspirado e processado imediatamente sem perturbar o pellet.

Preparação de reagentes e tampões

Preparação da protease QIAGEN

Adicionar todo o conteúdo do frasco que contém 4,4 ml de solvente de protease (PS) ao frasco de protease QIAGEN (QP) liofilizada e misturar cuidadosamente. Para evitar a formação de espuma, misturar, invertendo o frasco várias vezes. Assegurar que a protease QIAGEN (QP) está completamente dissolvida.



Não adicionar protease QIAGEN (QP) diretamente ao tampão de lise (AL).

Adição de ARN transportador e controlo interno ao tampão de lise

O ARN transportador serve para duas coisas. Primeiro, melhora a ligação dos ácidos nucleicos virais à membrana da coluna QIAamp MinElute, especialmente se houver muito poucas moléculas alvo na amostra. Segundo, a adição de grandes quantidades de ARN transportador reduz as hipóteses de degradação do ARN viral na eventualidade, rara, de as moléculas de RNase escaparem à desnaturação por sais caotrópicos e detergente no tampão de lise (AL). Se o ARN transportador não for adicionado ao tampão de lise (AL), isso pode levar a uma recuperação de ARN ou ADN virais reduzida.

O ARN transportador também pode ser incluído em alguns reagentes de controlo interno de ensaios comerciais a jusante. Nestes casos, consultar as instruções de utilização relevantes do fabricante do ensaio a jusante.

Recomenda-se vivamente a utilização de um controlo interno durante a utilização do QIAamp DSP Virus Kit em conjunto com sistemas de amplificação de diagnóstico. O ARN ou o ADN de controlo interno e o ARN transportador reconstituído devem ser adicionados ao tampão de lise (AL) e muito bem misturados invertendo o tubo 10 vezes. Para evitar a formação de espuma, não agitar com vórtex.

Consultar as instruções do fabricante para determinar a concentração ideal do controlo interno. A utilização de uma concentração diferente da recomendada pode originar resultados incorretos. Durante o cálculo da quantidade correta de controlo interno a utilizar, é necessário ter em consideração o volume inicial de amostra e o volume de eluição. Não esquecer que o QIAamp DSP Virus Kit utiliza um volume de amostra inicial de 500 µl.

Para preparar a solução de ARN transportador, adicionar 310 µl de tampão de eluição (AVE) ao tubo que contém 310 µg de ARN transportador liofilizado, a fim de obter uma solução de 1 µg/µl. Dissolver muito bem o ARN transportador, dividi-lo em alíquotas de dimensões convenientes e armazenar a -20 °C. Não congelar/descongelar as alíquotas de ARN transportador mais do que 2 vezes.

Ter em atenção que o ARN transportador não se dissolve no tampão de lise (AL). Tem de ser dissolvido primeiro no tampão de eluição (AVE) e depois adicionado ao tampão de lise (AL). Assegurar que o ARN transportador é completamente dissolvido no volume correto de tampão de eluição (AVE) antes de o misturar com o tampão de lise (AL).



Utilizar sempre o controlo interno correto para o ensaio a jusante. Consultar mais informações nas instruções do fabricante.

Calcular o volume de mistura de tampão de lise (AL)/ARN transportador por lote de amostras, seleccionando o número de amostras a processar em simultâneo, a partir da Tabela 4. Os volumes são calculados utilizando o seguinte cálculo de amostras:

$$n \times 0,55 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 11,2 \text{ } \mu\text{l/ml} = z \text{ } \mu\text{l}$$

sendo que: n = número de amostras a processar em simultâneo

y = volume calculado de tampão de lise (AL)

z = volume de ARN transportador/tampão de eluição (AVE) a adicionar ao tampão de lise (AL)

Tabela 4.-Volumes de tampão de lise (AL) e ARN transportador/tampão de eluição (AVE) necessários para o procedimento QIAamp DSP Vírus

N.º amostras	Vol. AL (ml)	Vol. ARN transportador/AVE (µl)	N.º amostras	Vol. AL (ml)	Vol. ARN transportador/AVE (µl)
1	0,55	6,2	13	7,15	80,0
2	1,10	12,3	14	7,70	86,0
3	1,65	18,5	15	8,25	92,4
4	2,20	24,6	16	8,80	98,6
5	2,75	30,8	17	9,35	104,7
6	3,30	37,0	18	9,90	110,9
7	3,85	43,1	19	10,45	117,0
8	4,40	49,3	20	11,00	123,2
9	4,95	55,0	21	11,55	129,4
10	5,50	61,6	22	12,10	135,5
11	6,05	67,8	23	12,65	141,7
12	6,60	73,9	24	13,20	147,8

Preparação do tampão de lavagem 1 (AW1)

Utilizando um cilindro graduado, adicionar 25 ml de etanol (96–100%) ao frasco que contém 19 ml de tampão de lavagem 1 (AW1) concentrado. Armazenar o tampão de lavagem 1 (AW1) reconstituído à temperatura ambiente (15–25 °C).



Misturar sempre o tampão de lavagem 1 (AW1) reconstituído, invertendo o frasco várias vezes, antes de iniciar o procedimento.

Preparação do tampão de lavagem 2 (AW2)

Utilizando um cilindro graduado, adicionar 30 ml de etanol (96–100%) ao frasco que contém 13 ml de tampão de lavagem 2 (AW2) concentrado. Armazenar o tampão de lavagem 2 (AW2) reconstituído à temperatura ambiente (15–25 °C).



Misturar sempre o tampão de lavagem 2 (AW2) reconstituído, invertendo o frasco várias vezes, antes de iniciar o procedimento.

Preparação do tampão de eluição (AVE)

São fornecidos juntamente com o kit quatro tubos de tampão de eluição (AVE). Ter cuidado para não contaminar o tampão com RNases. Caso se realizem 4 procedimentos de purificação ou menos utilizando um único kit, recomendamos que se descarte o tubo de tampão de eluição (AVE) no final de cada procedimento.

Eluição de ácidos nucleicos virais

Para aplicações a jusante que precisem de volumes iniciais pequenos (por ex., alguns ensaios PCR e RT-PCR), a utilização de ácidos nucleicos virais eluídos em 20 µl de tampão de eluição (AVE) poderá aumentar a sensibilidade do ensaio.

O volume de ácidos nucleicos virais eluídos de uma coluna QIAamp MinElute pode ter até 5 µl menos que o volume de tampão de eluição (AVE) aplicado à coluna. Por exemplo, a eluição de ácidos nucleicos virais com 60 µl de tampão de eluição (AVE) resulta num eluato de, aproximadamente, 55 µl, ao passo que eluir com 20 µl resulta em, aproximadamente, 15 µl de eluato.

O volume de eluato obtido depende da natureza da amostra. Se o volume de eluato obtido for demasiado reduzido para o ensaio a jusante, aumentar o volume adicionando mais tampão de eluição (AVE).

Os ácidos nucleicos virais eluídos são recolhidos em tubos de eluição (ET). Para um período de armazenamento dos ácidos nucleicos de até 24 horas, recomenda-se o armazenamento a 2–8 °C.

Rendimento e qualidade dos ácidos nucleicos virais

O rendimento e a qualidade dos ácidos nucleicos virais permitem que sejam utilizados em todos os tipos de procedimentos de deteção a jusante em diagnósticos moleculares. Os ensaios de diagnóstico devem ser realizados de acordo com as instruções do fabricante.

Montagem do sistema de vácuo QIAvac 24 Plus

Assegurar que o extensor da coluna (EXT), a coluna QIAamp MinElute, o conector de vácuo (VC) e a válvula de vácuo são corretamente instalados (ver a Figura 3).

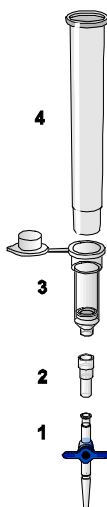


Figura 3. Montagem dos componentes do QIAamp DSP Virus Kit para o processamento de amostras com vácuo:

- | | |
|--|-----------------------------|
| 1: Válvula de vácuo (fornecida com o sistema de vácuo) | 3: Coluna QIAamp MinElute |
| 2: Conector de vácuo (VC) | 4: Extensor da coluna (EXT) |

Recomenda-se a rotulagem dos tubos de lise (LT), dos tubos de eluição (ET) e das colunas QIAamp MinElute para utilização com o sistema de vácuo QIAvac 24 Plus de acordo com o esquema na Figura 4 para evitar a mistura de amostras. Esta figura pode ser copiada e identificada com o nome das amostras.

Data: _____

Operador: _____

ID do ensaio: _____

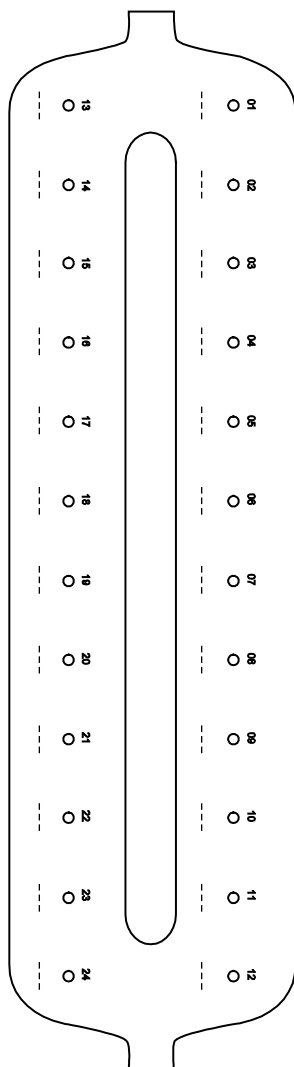


Figura 4. Esquema para identificar os tubos de lise (LT), os tubos de eluição (ET) e as colunas QIAamp MinElute para utilização com o sistema de vácuo QIAvac 24 Plus.

Protocolo: Isolamento e purificação de ácidos nucleicos virais de plasma e soro

Para o isolamento e purificação de ácidos nucleicos virais de 500 µl de plasma e soro tratados com EDTA ou citrato.

Aspetos importantes antes de iniciar o procedimento

- Equilibrar as amostras à temperatura ambiente (15–25 °C) e assegurar que estão bem misturadas.
- Adicionar ARN transportador reconstituído em tampão de eluição (AVE) ou controlo interno ao tampão de lise (AL), de acordo com as instruções na página 21.
- Assegurar que o tampão de lavagem 1 (AW1), o tampão de lavagem 2 (AW2) e a protease QIAGEN (QP) foram preparadas de acordo com as instruções constantes nas “Notas importantes”, na página 19.
- Equilibrar o tampão de eluição (AVE) à temperatura ambiente (15–25 °C) para ser utilizado no passo 18. Se possível, utilizar tampão de eluição (AVE) novo para cada procedimento (são fornecidos 4 tubos).
- Colocar um bloco de aquecimento a 56 °C, para ser utilizado nos passos 4 e 17.
- Evitar contaminação cruzada inserindo um conector de vácuo (VC) em cada adaptador luer do sistema de vácuo.
- Assegurar que o frasco de resíduos do sistema de vácuo está vazio e que todas as ligações estão corretamente ligadas.
- Para detalhes sobre o funcionamento do sistema de vácuo, especialmente no que se refere à manutenção, consultar o manual fornecido com o mesmo.

Procedimento

1. Pipetar 75 µl de protease QIAGEN (QP) para um tubo de lise (LT).



Verificar a data de validade da protease reconstituída antes de a utilizar.

- Adicionar 500 µl de plasma ou soro ao tubo de lise (LT).
- Adicionar 500 µl de tampão de lise (AL) (com 11,2 µg/ml de ARN transportador) ao tubo de lise (LT), fechar a tampa e agitar com um misturador de vórtice por impulsos durante 15 segundos.

Para assegurar um processo de lise eficaz é fundamental que a amostra e o tampão de lise (AL) sejam muito bem misturados até se obter uma solução homogénea.



O tampão de lise (AL) contém controlo interno. Como o tampão de lise (AL) apresenta uma elevada viscosidade, assegurar que é adicionado o volume correto de tampão de lise (AL), pipetando cuidadosamente ou utilizando uma pipeta apropriada, como a pipeta Eppendorf multistep ou equivalente.



Não adicionar protease QIAGEN (QP) diretamente ao tampão de lise (AL).

- Incubar a uma temperatura de 56 °C (± 1 °C) durante 15 minutos (± 1 minuto).
- Centrifugar o tubo de lise (LT) durante ≥ 5 segundos na velocidade máxima para remover as gotas do interior da tampa.



- Mudar de luvas e abrir cuidadosamente o tubo de lise (LT).
- Adicionar 600 µl de etanol (96–100%) ao tubo de lise (LT), fechar a tampa e misturar muito bem com um misturador de vórtice por impulsos durante ≥ 15 segundos. Incubar durante 5 minutos (± 1 minuto) à temperatura ambiente (15–25 °C).
- Centrifugar o tubo de lise (LT) durante ≥ 5 segundos na velocidade máxima para remover as gotas do interior da tampa.
- Inserir a coluna QIAamp MinElute dentro do conector de vácuo (VC) no sistema de vácuo (ver a Figura 3, página 27). Inserir um extensor da coluna (EXT) na coluna QIAamp MinElute aberta.



Manter o tubo de lavagem (WT) para a rotação a seco no passo 16.



10. Mudar de luvas e abrir apenas um tubo de cada vez.

11. Aplicar cuidadosamente todo o lisado obtido no passo 7 no extensor da coluna (EXT) da coluna QIAamp MinElute, sem molhar a borda. Evitar tocar na membrana da coluna QIAamp MinElute com a ponta da pipeta.

12. Ligar a bomba de vácuo. Quando o lisado tiver passado completamente através da coluna QIAamp MinElute, abrir a válvula do sistema de vácuo e libertar o vácuo.

Em caso de processamento de várias colunas QIAamp MinElute ao mesmo tempo, recomenda-se o fecho da válvula de vácuo de cada coluna depois de o lisado ter passado, para reduzir a duração deste passo de vácuo.



Se o lisado não tiver passado completamente através da membrana após 15 minutos, descartar a coluna QIAamp MinElute e repetir o procedimento com uma nova amostra.



Deve-se utilizar a válvula do sistema de vácuo para a libertação rápida da pressão de vácuo.

13. Aplicar 600 µl de tampão de lavagem 1 (AW1) na coluna QIAamp MinElute. Remover cuidadosamente e descartar o extensor da coluna (EXT) e fechar a válvula do sistema de vácuo. Depois de o tampão de lavagem 1 (AW1) ter passado através da coluna QIAamp MinElute, abrir a válvula e libertar o vácuo.



Para evitar contaminação cruzada, assegurar que os extensores da coluna (EXT) removidos não passam sobre as colunas QIAamp MinElute adjacentes.

14. Aplicar 750 µl de tampão de lavagem 2 (AW2) na coluna QIAamp MinElute sem molhar a borda. Evitar tocar na membrana da coluna QIAamp MinElute com a ponta da pipeta. Deixar a tampa da coluna aberta e fechar a válvula do sistema de vácuo. Depois de o tampão de lavagem 2 (AW2) ter passado através da coluna QIAamp MinElute, abrir a válvula e libertar o vácuo.

15. Aplicar 750 µl de etanol (96–100%) na coluna QIAamp MinElute sem molhar a borda. Evitar tocar na membrana da coluna QIAamp MinElute com a ponta da pipeta. Deixar a tampa da coluna aberta e fechar a válvula do sistema de vácuo. Depois de o etanol ter passado através da coluna QIAamp MinElute, abrir a válvula e libertar o vácuo.



Utilizar pontas de pipeta com proteção contra aerossóis para aplicar etanol na coluna QIAamp MinElute.

16. Fechar a tampa da coluna QIAamp MinElute, removê-la do sistema de vácuo e descartar o conector de vácuo (VC). Colocar a coluna QIAamp MinElute no tubo de lavagem (WT) guardado no passo 9 e centrifugar à velocidade máxima (aproximadamente 20 000 x g ou 14 000 rpm) durante 1 minuto para secar a membrana completamente. Descartar o tubo de lavagem (WT) que contém o filtrado.



A omissão da centrifugação a seco pode resultar em inibição do ensaio a jusante.

17. Colocar a coluna QIAamp MinElute num novo tubo de lavagem (WT) e incubar com a tampa aberta a 56 °C durante 3 minutos para evaporar qualquer líquido restante.
18. Colocar a coluna QIAamp MinElute num tubo de eluição (ET) limpo e descartar o tubo de lavagem (WT). Abrir cuidadosamente a tampa da coluna QIAamp MinElute e aplicar 20 µl ou 60 µl de tampão de eluição (AVE) (dependendo do ensaio a jusante) no centro da membrana. Fechar a tampa e incubar à temperatura ambiente (15–25 °C) durante ≥ 3 minutos. Centrifugar a toda a velocidade (aproximadamente 20 000 x g, ou 14 000 rpm) durante 1 minuto para eluir os ácidos nucleicos virais.



Seguir o procedimento de manutenção para o sistema de vácuo, depois de realizar este protocolo (para obter mais detalhes, consultar o manual fornecido com o sistema de vácuo).

Para obter informações de licenciamento atualizadas e renúncias de responsabilidade específicas do produto, consultar o respetivo manual do utilizador ou o manual do kit QIAGEN. Os manuais do kit QIAGEN e do utilizador estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser pedidos à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Histórico de revisões

Histórico de revisões do documento

R3 08/2018	Foi adicionada uma nota de rodapé com um esclarecimento acerca do n.º de cat. Vacuum Pump, ver página 18. Atualização de avisos e precauções. Atualização do formato do manual.
---------------	---

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Acordo de licenciamento limitado para o QIAamp DSP Virus Kit

A utilização deste produto implica a aceitação dos seguintes termos por parte de qualquer comprador ou utilizador do produto:

1. O produto deverá ser usado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e com o presente manual e recorrendo à utilização exclusiva de componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incluir os componentes englobados neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, no presente manual, e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com. Alguns dos referidos protocolos adicionais foram fornecidos por utilizadores QIAGEN para utilizadores QIAGEN. Os referidos protocolos não foram testados de forma exaustiva ou otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não assegura nem garante que os referidos protocolos não infringem os direitos de terceiros.
2. À exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infringem os direitos de terceiros.
3. Este kit e respetivos componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, recondicionados ou objeto de revenda.
4. A QIAGEN recusa especificamente qualquer outra licença, expressa ou implícita, à exceção das expressamente declaradas.
5. O comprador e o utilizador do kit concordam em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir a ou facilitar qualquer dos atos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de licença limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas de tribunal e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Contrato de licença limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou aos seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, visite www.qiagen.com.

Marcas comerciais: QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, MinElute® (Grupo QIAGEN); AMPLICOR HBV MONITOR®, AMPLICOR HCV MONITOR®, AMPLICOR HIV-1 MONITOR®, *cobas*®, TaqMan® (Grupo Roche); RealArt™ (*artus GmbH*); Eppendorf® (Eppendorf AG). Os nomes registados, as marcas comerciais, etc., utilizados neste documento, mesmo quando não assinalados especificamente como tal, não devem ser considerados como não protegidos por lei.

1114514 08/2018 HB-0109-003 © 2018 QIAGEN, todos os direitos reservados.

Encomendas www.qiagen.com/shop | Assistência técnica support.qiagen.com | Website www.qiagen.com