

Dezembro 2017

# Folha de protocolo QIASymphony<sup>®</sup> SP

## Protocolo Complex400\_V4\_DSP

Este documento é a *Folha de protocolo do QIASymphony SP: Complex400\_V4\_DSP* para o QIASymphony DSP  
Virus/Pathogen Midi Kit, versão 1, R2.

## Informações gerais

O QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit destina-se a utilização em diagnóstico *in vitro*.

<b>Kit</b>	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit
<b>Material de amostra</b>	Amostras respiratórias e urogenitais
<b>Nome do protocolo</b>	Complex400_V4_DSP
<b>Conjunto de controlo do ensaio predefinido</b>	ACS_Complex400_V4_DSP_default_IC
<b>Editável</b>	Volume de eluato: 60 µl, 85 µl, 110 µl
<b>Versão de software necessária</b>	Versão 4.0 ou posterior

## Bandeja "Sample" (Amostra)

<b>Tipo de amostra</b>	Amostras respiratórias (LBA, esfregaços secos, meio de transporte, aspirados, expetoração) e amostras urogenitais (urina, meio de transporte)
<b>Volume de amostra</b>	Depende do tipo de tubo de amostra utilizado; para obter mais informações ver <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a>
<b>Tubos de amostra primários</b>	Ver <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> para mais informações
<b>Tubos de amostra secundários</b>	Ver <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> para mais informações
<b>Introdutores</b>	Depende do tipo de tubo de amostra utilizado; para obter mais informações ver <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a>
<b>Outro</b>	É necessária mistura de ARN transportador–tampão AVE; a utilização de controlo interno é opcional

## Bandeja "Reagents and Consumables" (Reagentes e consumíveis)

<b>Posição A1 e/ou A2</b>	Cartucho de reagente (Reagent cartridge, RC)
<b>Posição B1</b>	Tampão ATL (ATL)
<b>Suporte de pontas 1–17</b>	Pontas com filtro descartáveis, 200 µl
<b>Suporte de pontas 1–17</b>	Pontas com filtro descartáveis, 1500 µl
<b>Suporte de caixa de unidades 1-4</b>	Caixas de unidades contendo cartuchos de preparação de amostras
<b>Suporte de caixa de unidades 1-4</b>	Caixas de unidades contendo mangas de 8 barras.

## Bandeja "Waste" (Resíduos)

Suporte de caixa de unidades 1-4	Caixas de unidades vazias
Suporte de saco de resíduos	Saco de resíduos
Suporte do frasco de resíduos líquidos	Frasco de resíduos líquidos

## Bandeja "Eluate" (Eluato)

Suporte de eluição (recomendamos a utilização da ranhura 1, posição de arrefecimento)	Ver <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> para mais informações
---	--

## Material de plástico necessário

	Um lote, 24 amostras*	Dois lotes, 48 amostras*	Três lotes, 72 amostras*	Quatro lotes, 96 amostras*
Pontas com filtro descartáveis, 200 µl†	34	60	86	112
Pontas com filtro descartáveis, 1500 µl†	123	205	295	385
Cartuchos de preparação de amostras‡	18	36	54	72
Mangas de 8 barras¶	3	6	9	12

\* Utilizar mais do que um controlo interno por lote e efetuar mais do que uma inventariação requer pontas com filtro descartáveis adicionais. A utilização de menos de 24 amostras por lote diminui o número de pontas com filtro descartáveis necessárias por ensaio.

† Estão disponíveis 32 pontas com filtro/suporte de pontas.

‡ O número de pontas com filtro necessárias inclui pontas com filtro para 1 inventariação por cartucho de reagente.

§ Estão disponíveis 28 cartuchos de preparação de amostras/caixa de unidades.

¶ Estão disponíveis doze mangas de 8 barras/caixa de unidades.

**Nota:** O número de pontas com filtro pode diferir dos números visualizados no ecrã tátil, dependendo das definições, por exemplo, dependendo do número de controlos internos utilizados por lote.

## Volume de eluição selecionado

Volume de eluição selecionado (µl)*	Volume de eluição inicial (µl)†
60	90
85	115
110	140

\* O volume de eluição selecionado no ecrã tátil. Este é o volume acessível mínimo de eluato no tubo de eluição final.

† O volume inicial da solução de eluição necessário para assegurar que o volume real de eluato é igual ao volume selecionado.

## Preparação de mistura de controlo interno–ARN transportador (CARRIER)–tampão AVE (AVE)

Volume de eluição selecionado (µl)	Volume ARN transportador de stock (CARRIER) (µl)	Volume controlo interno (µl)*	Volume Tampão AVE (AVE) (µl)	Volume final por amostra (µl)
60	3	9	108	120
85	3	11,5	105,5	120
110	3	14	103	120

\* O cálculo da quantidade de controlo interno baseia-se nos volumes de eluição iniciais. O volume morto adicional depende do tipo de tubo de amostra utilizado; ver [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks) para mais informações.

**Nota:** Os valores apresentados na tabela dizem respeito à preparação da mistura de controlo interno–ARN transportador (CARRIER) para um ensaio a jusante que necessite de 0,1 µl de controlo interno/µl eluato.

Os tubos com mistura de controlo interno–ARN transportador (CARRIER)–tampão AVE (AVE) são colocados num porta-tubos. O porta-tubos com mistura(s) de controlo interno–ARN transportador (CARRIER)–tampão AVE (AVE) tem de ser colocado na ranhura A da gaveta "sample" (amostra).

Dependendo do número de amostras a processar, recomendamos a utilização de tubos de 2 ml (Sarstedt, n.º cat. 72.693 ou 72.694) ou tubos de base redonda de 14 ml 17 x 100 mm em polistireno (Becton Dickinson, n.º cat. 352051) para diluir o controlo interno, tal como descrito na tabela abaixo. O volume pode ser repartido por 2 ou mais tubos.

### Calcular o volume da mistura de controlo interno

Tipo de tubo	Nome no ecrã tátil QIAasympyony	Cálculo do volume da mistura de controlo interno/ARN transportador (CARRIER)–tampão AVE (AVE) por tubo
Microtubo de 2 ml com tampa; microtubo de 2 ml, PP, COM SAIA, (Sarstedt, n.º cat. 72.694)	SAR#72.694 T2.0 ScrewSkirt	$(n \times 120 \mu\text{l}) + 360 \mu\text{l}^*$
Microtubo de 2 ml com tampa; microtubo de 2 ml, PP, SEM SAIA, (Sarstedt, n.º cat. 72.693)	SAR#72.693 T2.0 Screw	$(n \times 120 \mu\text{l}) + 360 \mu\text{l}^*$
Tubo de base redonda de 14 ml, 17 x 100 mm em polistireno (Becton Dickinson, n.º cat. 352051)	BD#352051 FalconPP 17x100	$(n \times 120 \mu\text{l}) + 600 \mu\text{l}^\dagger$

\* Utilizar esta equação para calcular o volume necessário de mistura de controlo interno ( $n$  = número de amostras; 120 µl = volume de mistura de controlo interno–ARN transportador (CARRIER)–tampão AVE (AVE); 360 µl = volume morto necessário por tubo). Por exemplo, para 12 amostras ( $n = 12$ ):  $(12 \times 120 \mu\text{l}) + 360 \mu\text{l} = 1800 \mu\text{l}$ . Não encher o tubo com mais de 1,9 ml (ou seja, um máximo de 12 amostras por tubo). Se forem processadas mais de 12 amostras, utilizar mais tubos, garantindo que o volume morto é acrescentado por tubo.

† Utilizar esta equação para calcular o volume necessário de mistura de controlo interno–ARN transportador (CARRIER)–tampão AVE (AVE) ( $n$  = número de amostras; 120 µl = volume da mistura de controlo interno–ARN transportador (CARRIER)–tampão AVE (AVE); 600 µl = volume morto necessário por tubo). Por exemplo, para 96 amostras ( $n = 96$ ):  $(96 \times 120 \mu\text{l}) + 600 \mu\text{l} = 12120 \mu\text{l}$ .

Ver [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks) relativamente aos introdutores necessários.

## Utilização de material de laboratório FIX

A utilização de deteção de nível líquido (liquid-level detection, LLD) para a transferência de amostra permite o recurso a tubos primários e secundários. Contudo, isso requer determinados volumes mortos nos respetivos tubos. A fim de minimizar os volumes mortos, devem ser usados tubos secundários sem deteção de nível líquido. Está disponível material de laboratório FIX específico (por ex. SAR\_FIX\_#72.694 T2.0 ScrewSkirt), que também pode ser selecionado no ecrã tátil do QIASymphony SP. Este tipo de tubo/suporte impõe restrições em termos de aspiração. A amostra é aspirada a uma determinada altura no tubo, definida pelo volume da amostra a ser transferida. Por isso, é fundamental garantir que é usado o volume que consta na lista do material de laboratório. As listas do material de laboratório estão disponíveis para transferência em [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks).

Os tubos de amostra que podem ser utilizados com ou sem deteção de nível líquido e os volumes de amostra necessários estão também listados em [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks). Não utilizar volumes superiores ou inferiores ao volume necessário, dado que isso pode dar origem a erros durante a preparação da amostra.

Os tubos para deteção de nível líquido e os tubos que não se destinam à deteção de nível líquido podem ser processados num único lote/ensaio.

## Preparação do material de amostra

Ao trabalhar com substâncias químicas, usar sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consultar as fichas de material de segurança (material safety data sheets, MSDS) adequadas, disponíveis no fornecedor do produto.

### Urina

A urina pode ser processada sem pré-tratamento. Transferir a amostra para um tubo de amostra Sarstedt de 2 ml (n.º cat. 72.693 ou 72.694) e colocar a amostra no porta-tubos. Como alternativa, podem ser utilizados tubos primários. O volume inicial mínimo necessário pode variar, dependendo do tubo primário utilizado. Os formatos de tubos primários e secundários compatíveis, incluindo o volume inicial mínimo necessário para cada protocolo, encontram-se listados em [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks). O sistema está otimizado para amostras de urina puras que não contêm conservantes. Para aumentar a sensibilidade para agentes patogénicos bacterianos, as amostras podem ser centrifugadas. Depois de eliminar

o sobrenadante, o pellet pode ser ressuspensão em, no mínimo, 500 µl de tampão ATL (ATL) (n.º cat. 939016). Transferir a amostra para um tubo Sarstedt de 2 ml (n.º cat. 72.693 ou 72.694). Colocar a amostra no porta-tubos e processar a amostra utilizando o protocolo Complex400\_V4\_DSP e o material de laboratório FIX necessário.

### Isolamento de ADN genómico a partir de bactérias Gram-positivas

A purificação de ADN pode ser melhorada no caso de algumas bactérias Gram-positivas através de pré-tratamento enzimático, antes de transferir a amostra para o QIASymphony SP e de iniciar o protocolo Complex400\_V4\_DSP.

1. Fazer um pellet de bactérias centrifugando a 5000 x g durante 10 minutos.
2. Suspende o pellet bacteriano em 500 µl de solução enzimática apropriada (20 mg/ml de lisozima ou 200 µg/ml de lisostafina; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA; 1,2% Triton X-100).
3. Incubar o tubo a 37 °C durante, pelo menos, 30 minutos (± 2 minutos).
4. Centrifugar o tubo, durante breves instantes, para remover gotas do interior da tampa.
5. Transferir a amostra para um tubo Sarstedt de 2 ml (n.º cat. 72.693 ou 72.694), colocar a amostra no porta-tubos e continuar com o protocolo Complex400\_V4\_DSP utilizando o material de laboratório FIX necessário.

### Amostras viscosas ou mucosas

Algumas amostras (por ex., expetoração, aspirados respiratórios) podem ser viscosas e necessitar de liquefação para permitir a pipetagem. As amostras de baixa viscosidade não requerem qualquer preparação adicional. As amostras de viscosidade média a alta devem ser preparadas da seguinte forma:

1. Diluir a amostra 1:1 com Sputasol\*† (Oxoid, n.º cat. SR0233) ou 0,3% (p/v) DTT.  
**Nota:** A solução de 0,3% (p/v) DTT pode ser feita antecipadamente e armazenada em alíquotas a -20 °C. Eliminar as alíquotas descongeladas após a utilização.
2. Incubar a 37 °C até a viscosidade da amostra ser adequada para pipetagem.
3. Transferir no mínimo 500 µl de amostra para um tubo Sarstedt de 2 ml (n.º cat. 72.693 ou 72.694). Processar a amostra utilizando o protocolo Complex400\_V4\_DSP.

\* Sputasol (Oxoid, n.º cat. SR0233, [www.oxoid.com](http://www.oxoid.com)) ou ditiotreitól (DTT).

† Esta não é uma lista completa de fornecedores.

## Fluidos corporais e esfregaços de secreção secos

1. Mergulhar a ponta da zaragatoa com esfregaço seco em 750 µl de tampão ATL (ATL) (n.º cat. 939016) e incubar a 56 °C durante 15 minutos ( $\pm$  1 minuto) mexendo sempre. Se não for possível misturar, agitar em vórtex antes e depois da incubação durante, pelo menos, 10 segundos.
2. Remover a zaragatoa e espremer todo o líquido pressionando-a contra o interior do tubo.
3. Transferir no mínimo 500 µl de amostra para um tubo Sarstedt de 2 ml (n.º cat. 72.693 ou 72.694). Processar a amostra com o protocolo Complex400\_V4\_DSP.

**Nota:** Este protocolo está otimizado para zaragatoas de algodão ou de polietileno.

Quando forem utilizados outros tipos de zaragatoas, poderá ser necessário ajustar o volume de tampão ATL (ATL) para garantir que estão disponíveis no mínimo 500 µl de material de amostra.

## Esfregaços respiratórios ou urogenitais armazenados em meio de transporte

O meio de armazenamento de zaragatoas de esfregaços respiratórios ou urogenitais pode ser utilizado sem pré-tratamento. Se a zaragatoa não tiver sido retirada, deverá ser comprimida contra a parede do tubo para forçar o líquido a sair. Qualquer excesso de muco na amostra deverá ser retirado neste momento e ser recolhido na zaragatoa. Qualquer líquido residual do muco e do esfregaço deverá então ser forçado a sair comprimindo a zaragatoa contra a parede do tubo. Por último, a zaragatoa e o muco deverão ser retirados e eliminados. Se as amostras forem viscosas, efetuar uma etapa de liquefação (ver "Amostras viscosas ou mucosas" acima) antes de transferir a amostra para o QIASymphony SP. Se não houver material inicial suficiente, pipetar o tampão ATL (ATL) para o meio de transporte para ajustar o volume inicial mínimo necessário e agitar a amostra em vórtex durante 15–30 segundos no tubo (se a zaragatoa estiver dentro do meio de transporte, efetuar esta etapa antes de a retirar). Transferir a amostra para um tubo de amostra Sarstedt de 2 ml (n.º cat. 72.693 ou 72.694) e colocar a amostra no porta-tubos. Como alternativa, podem ser utilizados tubos primários. O volume inicial mínimo necessário pode variar, dependendo do tubo primário utilizado. Os tubos primários e secundários compatíveis, incluindo o volume inicial mínimo necessário para cada protocolo, encontram-se listados em [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks).

## Histórico de revisões

Histórico de revisões do documento	
12-2017 R2	Atualização da versão de software 5.0 do QIASymphony

Para informações atualizadas sobre licenciamento e limitações de responsabilidade específicas do produto, consultar os respetivos manual do utilizador ou manual do kit QIAGEN®. Os manuais do utilizador e os manuais do kit QIAGEN estão disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ou podem ser solicitados à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Marcas comerciais: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (Grupo QIAGEN). Os nomes registados, as marcas comerciais etc. utilizados neste documento, mesmo quando não assinalados como tal, não devem ser considerados como não protegidos por lei.  
12/2017 HB-0301-S28-002 © 2017 QIAGEN, todos os direitos reservados.



---

Encomendas [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Assistência técnica [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Website [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)