

Dezembro 2017

Ficha de protocolo do QIASymphony[®] SP

Protocolo Complex400_V4_DSP

O presente documento consiste na *ficha de protocolo Complex400_V4_DSP do QIASymphony SP, R2*, para o QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, versão 1.

Informações gerais

O QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit destina-se ao uso no diagnóstico in vitro.

Kit	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit
Material de amostra	Amostras respiratórias e urogenitais
Nome do protocolo	Complex400_V4_DSP
Conjunto padrão de controle de teste	ACS_Complex400_V4_DSP_default_IC
Editável	Volume da substância eluída: 60 µl, 85 µl, 110 µl
Versão de software necessária	Versão 4.0 ou superior

Gaveta "Sample" (Amostra)

Tipo de amostra	Amostras respiratórias (lavado broncoalveolar, esfregaços secos, meios de transporte, aspirados, expectorados) e amostras urogenitais (urina, meios de transporte)
Volume de amostra	Depende do tipo de tubo de amostra utilizado. Para mais informações, acesse www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Tubos de amostra primários	Consulte o site www.qiagen.com/goto/dsphandbooks para obter mais informações
Tubos de amostra secundários	Consulte o site www.qiagen.com/goto/dsphandbooks para obter mais informações
Intrdutores	Depende do tipo de tubo de amostra utilizado. Para mais informações, acesse www.qiagen.com/goto/dsphandbooks
Outros	Necessária mistura de RNA transportador-tampão AVE. O uso do controle interno é opcional

Gaveta "Reagents and Consumables" (Reagentes e materiais de consumo)

Posição A1 e/ou A2	Cartucho de reagentes (Reagent cartridge, RC)
Posição B1	Tampão ATL (ATL)
Suporte de rack para ponteiras, 1-17	Ponteiras com filtro descartáveis, 200 µl
Suporte de rack para ponteiras, 1-17	Ponteiras com filtro descartáveis, 1500 µl
Suporte de caixa unitária, 1-4	Caixas unitárias com cartuchos de preparo de amostra
Suporte de caixa unitária, 1-4	Caixas unitárias contendo tampas de 8 hastes

Gaveta "Waste" (Resíduos)

Suporte de caixa unitária, 1-4	Caixas unitárias vazias
Suporte de saco de resíduos	Saco de resíduos
Suporte de recipiente de resíduos líquidos	Recipiente de resíduos líquidos

Gaveta "Eluate" (Eluição)

Rack de eluição (recomenda-se utilizar a fenda 1, na posição de resfriamento)	Consulte o site www.qiagen.com/goto/dsphandbooks para obter mais informações
---	--

Materiais plásticos necessários

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

* O uso de mais de um controle interno por lote e a execução de mais de uma verificação de inventário exige ponteiras com filtro descartáveis adicionais. O uso de menos de 24 amostras por lote reduz o número de ponteiras com filtro descartáveis necessárias por execução de teste.

† Há 32 ponteiras com filtro por rack para ponteiras.

‡ O número necessário de ponteiras com filtro inclui as ponteiras com filtro para 1 verificação de inventário por cartucho de reagentes.

§ Há 28 cartuchos de preparo de amostra por caixa unitária.

¶ Há doze tampas de 8 hastes por caixa unitária.

Nota: Dependendo das configurações, a quantidade de ponteiras com filtro fornecida pode diferir da quantidade exibida na tela sensível ao toque. Por exemplo, o número de controles 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 na tela sensível ao toque. Esse é o volume mínimo acessível de eluído no tubo de eluição final.

† O volume inicial da solução de eluição necessário para garantir que o volume real de eluído seja igual ao volume selecionado.

Preparação da mistura de controle interno, RNA transportador (TRANSPORTADOR) e tampão Buffer AVE (AVE)

Volume de eluição selecionado (µl)	Volume de RNA transportador (CARRIER) concentrado (µl)	Volume de controle interno (µl)*	Volume de 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 controle interno baseia-se nos volumes iniciais de eluição. O volume morto adicional depende do tipo de tubo de amostra usado. Consulte o site www.qiagen.com/goto/dsphandbooks para obter mais informações.

Nota: Os valores exibidos na tabela são para a preparação da mistura de controle interno e RNA transportador (TRANSPORTADOR) para um ensaio posterior que requer 0,1 µl de controle interno por µl de eluído.

Os tubos que contêm a mistura de controle interno, RNA transportador (TRANSPORTADOR) e tampão AVE (AVE) são colocadas em um porta-tubos. O porta-tubos que contém a(s) mistura(s) de controle interno, RNA transportador (TRANSPORTADOR) e tampão AVE (AVE) devem ser colocados na fenda A da gaveta de amostra.

Dependendo do número de amostras a serem processadas, recomendamos utilizar tubos de 2 ml (Sarstedt, n° cat.. 72.693 ou 72.694) ou tubos de poliestireno com fundo redondo de 14 ml 17 x 100 mm (Becton Dickinson, Ref. 352051) para a diluição do controle interno, como descreve a tabela abaixo. O volume pode ser dividido em 2 ou mais tubos.

Cálculo do volume da mistura de controle interno

Tipo de tubo	Nome na tela sensível ao toque do QIAAsymphony	Cálculo do volume de mistura de controle interno, RNA transportador (TRANSPORTADOR) e tampão Buffer AVE (AVE) por tubo
Microtubo de 2 ml com tampa; microtubo de 2 ml, PP, SKIRTED, (Sarstedt, Ref. 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, NON-SKIRTED, (Sarstedt, Ref. 72.693)	SAR#72.693 T2.0 Screw	$(n \times 120 \mu\text{l}) + 360 \mu\text{l}^*$
Tubo de 14 ml, 17 x 100 mm, poliestireno, fundo redondo (Becton Dickinson, Ref. 352051)	BD#352051 FalconPP 17x100	$(n \times 120 \mu\text{l}) + 600 \mu\text{l}^\dagger$

* Use a seguinte equação para calcular o volume necessário de mistura de controle interno (n = número de amostras; $120 \mu\text{l}$ = volume de mistura de controle interno, RNA transportador (TRANSPORTADOR) e tampão AVE (AVE); $360 \mu\text{l}$ = 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 encha o tubo com mais do que 1,9 ml (ou sejam, no máximo 12 amostras por tubo). Se mais de 12 amostras serão processadas, use tubos adicionais, assegurando que o volume morto seja adicionado em cada tubo.

† Use a seguinte equação para calcular o volume necessário de mistura de controle interno, RNA transportador (TRANSPORTADOR) e tampão AVE (AVE) (n = número de amostras; $120 \mu\text{l}$ = volume da mistura de controle interno, RNA transportador (TRANSPORTADOR) e tampão AVE (AVE); $600 \mu\text{l}$ = volume morto necessário por tubo). Por exemplo, para 96 amostras ($n = 96$): $(96 \times 120 \mu\text{l}) + 600 \mu\text{l} = 12120 \mu\text{l}$.

Consulte o site www.qiagen.com/goto/dsphandbooks para obter os folhetos necessários.

Como utilizar material de laboratório FIX

O uso da detecção de nível do líquido (liquid-level detection, LLD) para transferência de amostras possibilita o uso de tubos primários e secundários. No entanto, isso exige que se deixe determinados volumes mortos nos respectivos tubos. Para minimizar os volumes mortos, devem ser utilizados tubos secundários sem detecção de nível do líquido. O material de laboratório FIX está disponível (por ex., SAR_FIX_#72.694 T2.0 ScrewSkirt) e também pode ser selecionado na tela sensível ao toque do QIAAsymphony SP. Esse tipo de tubo ou rack impõe restrições de aspiração. A amostra é aspirada em uma determinada altura no tubo que é definido pelo volume de amostra a ser transferida. Portanto, é essencial assegurar que o volume listado na lista de material de laboratório seja utilizado. As listas de material de laboratório estão disponíveis para download no site www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Os tubos de amostra que podem ser usados com ou sem detecção de nível do líquido e os volumes de amostra necessários também encontram-se relacionados no site www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Não utilize volume maior ou menor do que o volume necessário, pois isso pode levar a erros durante a preparação das amostras.

Os tubos para detecção de nível do líquido e os tubos que não se destinam à detecção de nível do líquido podem ser processados em um lote ou execução.

Preparo de material de amostra

Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança do material (material safety data sheets, MSDSs) disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

Urina

A urina pode ser processada sem pré-tratamento adicional. Transfira a amostra para um tubo de 2 ml Sarstedt (Ref. 72.693 ou 72.694) e coloque-a dentro do porta-tubos. Ou, como alternativa, podem ser utilizados tubos primários. O volume mínimo inicial necessário pode variar, dependendo do tubo primário utilizado. Os formatos compatíveis de tubos primários e secundários, incluindo o volume mínimo inicial necessário para cada protocolo, encontram-se no site www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. O sistema é otimizado para amostras de urina pura que não contêm conservantes. Para aumentar a sensibilidade a patógenos bacterianos, as amostras podem ser centrifugadas. Depois de descartar o sobrenadante, o grânulo pode ser suspenso novamente em, pelo menos, 500 µl de tampão ATL (ATL) (Ref. 939016). Transfira a amostra para um tubo de 2 ml Sarstedt (Ref. 72.693 ou 72.694). Coloque a amostra no porta-tubos e processe-a utilizando o protocolo Complex400_V4_DSP e o material de laboratório FIX necessário.

Isolamento de DNA genômico de bactérias Gram-positivas

A purificação do DNA pode ser aprimorada para algumas bactérias Gram-positivas por meio de pré-tratamento enzimático antes da transferência para o QIA Symphony SP e do início do protocolo Complex400_V4_DSP.

1. Coloque os grânulos com bactérias em centrifugação a 5000 x g durante 10 minutos.
2. Suspenda o grânulo bacteriano em 500 µl da solução de enzima apropriada (20 mg/ml de lisozima ou 200 µg/ml de lisostapina em 20 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 2 mM de EDTA; 1,2% de Triton X-100).
3. Incube a 37 °C por no mínimo 30 minutos (± 2 minutos).
4. Centrifugar brevemente o tubo para remover as gotas de dentro da tampa.
5. Transfira a amostra para um tubo de 2 ml Sarstedt (Ref. 72.693 ou 72.694), coloque-a no porta-tubos e continue o protocolo Complex400_V4_DSP usando o material de laboratório FIX necessário.

Amostras viscosas ou de mucosas

Algumas amostras (por ex., de expectoração, aspirados respiratórios) podem ser viscosas e precisar de liquefação para permitir a pipetagem. Amostras com baixa viscosidade não precisam de preparação adicional. Amostras com média a alta viscosidade devem ser preparadas da seguinte maneira:

1. Dilua a amostra em proporção de 1:1 com Sputasol*† (Oxoid, Ref. SR0233) ou 0,3% (w/v) de DTT.
Nota: A solução de 0,3% (w/v) de DTT pode ser feita antecipadamente e armazenada em porções a -20 °C. Descarte as porções descongeladas após o uso.
2. Incube a 37 °C até que a viscosidade da amostra esteja adequada para pipetagem.
3. Transfira pelo menos 500 µl da amostra para um tubo de 2 ml Sarstedt (Ref. 72.693 ou 72.694). Processe a amostra usando o protocolo Complex400_V4_DSP.

Esfregaços secos de fluidos ou secreções corporais

1. Submerja a ponta do esfregaço seco em 750 µl de tampão ATL (ATL) (Ref. 939016) e a incube a 56 °C durante 15 minutos (± 1 minuto), misturando continuamente. Se não for possível misturar, realize agitação forte antes e depois da incubação por no mínimo 10 segundos.
2. Remova o esfregaço e esprema todo o líquido pressionando o esfregaço contra o interior do tubo.
3. Transfira pelo menos 500 µl da amostra para um tubo de 2 ml Sarstedt (Ref. 72.693 ou 72.694). Processe a amostra com o protocolo Complex400_V4_DSP.

Nota: Este protocolo é otimizado para esfregaços de algodão ou polietileno. Ao utilizar outros esfregaços, pode ser necessário ajustar o volume do tampão ATL (ATL) para garantir que pelo menos 500 µl seja disponibilizado como material de amostra.

Esfregaços respiratórios ou urogenitais em meios de transporte

Meios de armazenamento para esfregaços respiratórios ou urogenitais podem ser utilizados sem pré-tratamento. Se o esfregaço não foi removido, pressione-o contra a lateral do tubo para espremer o líquido. Qualquer excesso de muco no espécime deve ser removido nesse momento, coletando-o no esfregaço. Qualquer líquido residual do muco e do esfregaço deve então ser

* Sputasol (Oxoid, Ref. SR0233, www.oxoid.com) ou ditiotreitil (DTT).

† Não é uma lista completa de fornecedores.

espremido pressionando o esfregaço contra a lateral do tubo. Por fim, o esfregaço e o muco devem ser removidos e descartados. Se as amostras forem viscosas, proceda à etapa de liquefação (consulte “Amostras viscosas ou de mucosas” acima) antes de transferir a amostra para o QIASymphony SP. Se não houver material inicial suficiente, pipete o tampão ATL (ATL) dentro do meio de transporte para ajustar o volume mínimo inicial necessário e agite fortemente a amostra durante 15 a 30 segundos no tubo (se o meio de transporte contém o esfregaço, realize esta etapa antes de remover o esfregaço). Transfira a amostra para um tubo de 2 ml Sarstedt (Ref. 72.693 ou 72.694) e coloque-a no porta-tubos. Ou, como alternativa, podem ser utilizados tubos primários. O volume mínimo inicial necessário pode variar, dependendo do tubo primário utilizado. Os tubos primários e secundários compatíveis, incluindo o volume mínimo inicial necessário para cada protocolo, encontram-se no site www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Histórico de revisão

Histórico de revisão do documento	
R2 12/2017	Atualização para o software QIASymphony versão 5.0

Para informações atualizadas sobre licenças e avisos legais específicos de produtos, consulte o manual do kit da QIAGEN® pertinente ou o manual do usuário. Os manuais de instruções dos kits da QIAGEN e os manuais do usuário estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados aos Serviços técnicos da QIAGEN ou ao distribuidor local.

Marcas registradas: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (Grupo QIAGEN). Os nomes registrados, marcas registradas, etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcados especificamente como tais, não devem ser considerados como não protegidos pela lei.
12/2017 HB-0301-S28-002 © 2017 QIAGEN. Todos os direitos reservados.

Pedido www.qiagen.com/shop | Assistência Técnica support.qiagen.com | Site www.qiagen.com