

Dezembro 2017

Ficha de protocolo do QIAasymphony[®] SP

Protocolo Complex400_OBL_V4_DSP

O presente documento consiste na *ficha de protocolo Complex400_OBL_V4_DSP* do QIAasymphony SP, R2, para o QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, versão 1.

Informações gerais

O QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit destinase ao uso no diagnóstico in vitro.

Kit	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit
Material de amostra	Amostras respiratórias e urogenitais
Nome do protocolo	Complex400_OBL_V4_DSP
Conjunto padrão de controle de teste	ACS_Complex400_OBL_V4_DSP
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
Introdutores	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	n/a
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

n/a = não aplicável.

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/dsphanbooks 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†	96	96	128	128
Ponteiras com filtro descartáveis, 1500 µl†	128	192	224	288
Cartuchos de preparo de amostra§	18	36	54	72
Tampas de 8 hastes¶	3	6	9	12

* A execução de mais de uma leitura do conteúdo requer ponteiras com filtro descartáveis adicionais. O uso de menos de 24 amostras por lote reduz o número de ponteiras 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.

Lise fora do equipamento

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.

Os Protocolos complexos do QIASymphony consistem em 4 etapas: lise, ligação, lavagem e eluição. Para algumas amostras, vale realizar a lise manualmente. Por exemplo, para a inativação de patógenos em um gabinete de biossegurança. Os protocolos Complex400_OBL_V4_DSP permitem que a lise manual seja realizada da mesma maneira que o protocolo Complex400_V4_DSP. As amostras pré-tratadas são transferidas para o QIASymphony SP e processadas com o protocolo Complex400_OBL_V4_DSP.

Nota: O protocolo Complex400_OBL_V4_DSP precisa de tampão ACL e tampão ATL (ATL). O tampão ACL (Ref. 939017) e o tampão ATL (ATL) (Ref. 939016) não fazem parte do QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit e devem ser adquiridos separadamente.

Lise manual

1. Pipete 40 µl de proteinase K, 165 µl de tampão ATL (ATL), 120 µl de mistura de RNA transportador com controle interno e 315 µl de tampão ACL em um tubo de 2 ml Sarstedt (Ref. 72.693 ou 72.694).

Nota: Quando mais de uma amostra for processada usando a lise manual, pode ser preparada uma solução estoque a partir desta solução. Simplesmente multiplique os volumes necessários para uma amostra pelo número total de amostras a serem processadas

e inclua o volume adicional no equivalente de 2 amostras extra. Inverta o tubo várias vezes para misturar, transfira 640 µl para um tubo de 2 ml Sarstedt para cada amostra, e depois continue para cada amostra até a etapa 4.

2. Feche a tampa e misture invertendo o tubo 5 vezes.
3. Centrifugue brevemente o tubo para remover as gotas de dentro da tampa.
4. Adicione 400 µl de amostra ao tubo, feche a tampa e misture em agitador de pulso por 10 segundos.
5. Incube o tubo a 68 °C durante 15 minutos (\pm 1 minuto).
6. Centrifugue brevemente o tubo para remover as gotas de dentro da tampa.
7. Coloque os introdutores dos tubos de amostra apropriados em um porta-tubos e carregue os tubos de amostra (sem tampa).

Preparo de material de amostra

Urina

A urina pode ser processada sem pré-tratamento adicional. 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, 400 µl de tampão ATL (ATL) (Ref. 939016). Use 400 µl do material pré-tratado como amostra para preparação da lise fora do equipamento.

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 QIAasymphony SP e do início do protocolo Complex400_OBL_V4_DSP.

1. Coloque os grânulos com bactérias em centrifugação a 5000 x g durante 10 minutos.
2. Suspenda o grânulo bacteriano em 400 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 (\pm 2 minutos).
4. Centrifugar brevemente o tubo para remover as gotas de dentro da tampa.
5. Use 400 µl do material pré-tratado como amostra para preparação da lise fora do equipamento.

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 % de DTT pode ser feita antecipadamente e armazenada a -20°C em porções apropriadas. As porções descongeladas devem ser descartadas após o uso.
2. Incube a 37 °C até que a viscosidade da amostra esteja adequada para pipetagem.
3. Use 400 µl do material pré-tratado como amostra para preparação da lise fora do equipamento.

Esfregaços secos de fluidos ou secreções corporais

1. Submerja a ponta do esfregaço seco em 650 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. Use 400 µl do material pré-tratado como amostra para preparação da lise fora do equipamento.
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 400 µl seja disponibilizado como material de amostra.

Esfregaços respiratórios ou urogenitais

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). Use 400 µl do material como amostra para preparação da lise fora do equipamento.

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-S29-002 © 2017 QIAGEN. Todos os direitos reservados.

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