

Dezembro 2017

Folha de protocolo QIASymphony[®] SP

Protocolo Complex400_OBL_V4_DSP

Este documento é a *Folha de protocolo do QIASymphony SP: Complex400_OBL_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*.

Kit	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit
Material de amostra	Amostras respiratórias e urogenitais
Nome do protocolo	Complex400_OBL_V4_DSP
Conjunto de controlo do ensaio predefinido	ACS_Complex400_OBL_V4_DSP
Editável	Volume de eluato: 60 µl, 85 µl, 110 µl
Versão de software necessária	Versão 4.0 ou posterior

Bandeja "Sample" (Amostra)

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

Bandeja "Reagents and Consumables" (Reagentes e consumíveis)

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

n/a = não aplicável.

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 www.qiagen.com/goto/dsphandbooks 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 ^{††}	96	96	128	128
Pontas com filtro descartáveis, 1500 µl ^{††}	128	192	224	288
Cartuchos de preparação de amostras [§]	18	36	54	72
Mangas de 8 barras [¶]	3	6	9	12

* A realização de 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 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 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.

Lise fora do instrumento

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.

Os protocolos Complex QIASymphony são constituídos por 4 etapas: lise, ligação, lavagem e eluição. Para algumas amostras, é útil efetuar a lise manualmente, por exemplo, para inativação de agentes patogénicos num armário de biossegurança. O protocolo Complex400_OBL_V4_DSP permite que a lise manual seja efetuada de forma semelhante à do protocolo Complex400_V4_DSP. As amostras previamente tratadas são transferidas para o QIASymphony SP e processadas com o protocolo Complex400_OBL_V4_DSP.

Nota: O protocolo Complex400_OBL_V4_DSP requer tampão ACL e tampão ATL (ATL). O tampão ACL (n.º cat. 939017) e o tampão ATL (ATL) (n.º cat. 939016) não fazem parte do QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit e têm de ser encomendados separadamente.

Lise manual

1. Pipetar 40 µl de proteinase K, 165 µl de tampão ATL (ATL), 120 µl de mistura de controlo interno de ARN transportador e 315 µl de tampão ACL para um tubo Sarstedt de 2 ml (n.º cat. 72.693 ou 72.694).

Nota: Quando for necessário processar mais do que um amostra utilizando lise manual, pode ser preparada uma solução-mãe desta solução. Basta multiplicar os volumes necessários para uma amostra pelo número total de amostras que vão ser processadas e

incluir o volume adicional ao equivalente a 2 amostras extra. Inverter o tubo várias vezes para misturar, transferir 640 µl para um tubo Sarstedt de 2 ml para cada amostra e depois continuar para cada amostra com a etapa 4.

2. Fechar a tampa e misturar invertendo o tubo 5 vezes.
3. Centrifugar o tubo, durante breves instantes, para retirar gotículas do interior da tampa.
4. Acrescentar uma amostra de 400 µl ao tubo, fechar a tampa e misturar agitando em vórtex pulsado durante 10 segundos.
5. Incubar o tubo a 68 °C durante 15 minutos (± 1 minuto).
6. Centrifugar o tubo, durante breves instantes, para retirar gotículas do interior da tampa.
7. Colocar os introdutores dos tubos de amostra apropriados num porta-tubos e carregar os tubos de amostra (sem tampas).

Preparação do material de amostra

Urina

A urina pode ser processada sem pré-tratamento. 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 ressuspenso em, no mínimo, 400 µl de tampão ATL (ATL) (n.º cat. 939016). Utilizar 400 µl do material pré-tratado como amostra para preparação da lise fora do instrumento.

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 QIAAsymphony SP e de iniciar o protocolo Complex400_OBL_V4_DSP.

1. Fazer um pellet de bactérias centrifugando a 5000 x g durante 10 minutos.
2. Suspender o pellet bacteriano em 400 µl de solução enzimática apropriada (20 mg/ml de lisozima ou 200 µg/ml de lisostafina em 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. Utilizar 400 µl do material pré-tratado como amostra para preparação da lise fora do instrumento.

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 DTT a 0,3 % pode ser feita antecipadamente e armazenada a –20 °C em alíquotas apropriadas. As alíquotas descongeladas deverão ser eliminadas após a utilização.
2. Incubar a 37 °C até a viscosidade da amostra ser adequada para pipetagem.
3. Utilizar 400 µl do material pré-tratado como amostra para preparação da lise fora do instrumento.

Fluidos corporais e esfregaços de secreção secos

1. Mergulhar a ponta da zaragatoa com esfregaço seco em 650 µl de tampão ATL (ATL) (n.º cat. 939016) e incubar a 56 °C durante 15 minutos (± 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. Utilizar 400 µl do material pré-tratado como amostra para preparação da lise fora do instrumento.

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 400 µl de material de amostra.

Esfregaços respiratórios ou urogenitais

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

* Sputasol (Oxoid, n.º cat. SR0233, www.oxoid.com) ou ditiotreitil (DTT).

† Esta não é uma lista completa de fornecedores.

esfregação 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). Utilizar 400 µl do material como amostra para preparação da lise fora do instrumento.

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 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-S29-002 © 2017 QIAGEN, todos os direitos reservados.

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