

Instruções de uso (Manual) do QIAamp[®] DSP Virus Kit



Versão 2



Para uso em diagnóstico in vitro

Para uso com o QIAamp[®] DSP Virus Kit



60704



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA



1127541PTBR

Conteúdo

Uso previsto	4
Usuário previsto	4
Descrição e princípio	5
Lise com a QIAGEN Protease (QP)	5
Adsorção para a membrana da QIAamp MinElute	5
Remoção de contaminantes residuais.....	6
Eluição de ácidos nucleicos virais	6
Rendimento e qualidade dos ácidos nucleicos virais.....	7
Adição de controles internos.....	8
Resumo e explicação	10
Materiais fornecidos	11
Conteúdo do kit	11
Componentes do kit.....	12
Materiais necessários, mas não fornecidos	13
Reagentes adicionais	13
Consumíveis	13
Equipamento.....	13
Avisos e precauções	14
Informações de segurança.....	14
Informações de emergência.....	15
Precauções	16
Descarte.....	17

Armazenamento e manuseio de reagentes	18
Estabilidade em uso.....	18
Transporte, armazenamento e manuseio de espécimes	20
Notas importantes	22
Pontos importantes antes de começar	22
Manuseio das colunas QIAamp MinElute	23
Preparo de reagentes e tampões.....	23
Montagem do sistema de vácuo QIAvac 24 Plus	28
Protocolo: Isolamento e purificação de ácidos nucleicos virais de plasma e soro.....	30
Controle de qualidade	35
Limitações.....	36
Características de desempenho	37
Guia de solução de problemas	38
Símbolos	43
Anexo	46
Informações sobre pedidos	47
Histórico de revisões do documento.....	48

Uso previsto

O QIAamp® DSP Virus Kit destina-se ao isolamento e à purificação manual de ácidos nucleicos virais a partir de amostras de plasma ou soro humanos.

O QIAamp DSP Virus Kit usa tecnologia de membrana de sílica (tecnologia QIAamp) para isolamento e purificação de ácidos nucleicos virais de amostras de plasma ou soro humanos.

O produto destina-se a ser usado para diagnóstico in vitro e por usuários profissionais, como técnicos e médicos treinados em técnicas de biologia molecular.

Usuário previsto

O produto deve ser usado por profissionais como técnicos e médicos com formação nas técnicas de biologia molecular.

Descrição e princípio

O procedimento do QIAamp DSP Virus é constituído por 4 etapas (lise, ligação, lavagem e eluição) e é realizado usando as colunas QIAamp MinElute® em conjunto com um coletor de vácuo e uma microcentrífuga padrão. O procedimento foi concebido para minimizar o potencial de contaminação cruzada entre amostras e permite o manuseio seguro de amostras potencialmente infecciosas. O procedimento do QIAamp DSP Virus é simples e adequado para o processamento de várias amostras em simultâneo. O QIAamp DSP Virus Kit pode ser usado para o isolamento de RNA e DNA virais de uma vasta gama de vírus de RNA e DNA. Contudo, não foram estabelecidas características de desempenho para cada espécie de vírus; o usuário deve validá-las.

Lise com a QIAGEN Protease (QP)

As amostras são lisadas sob condições de desnaturação a temperaturas elevadas. A lise é realizada na presença de QIAGEN Protease (QP) e tampão de lise (AL), garantindo juntos a inativação de RNases.

Adsorção para a membrana da QIAamp MinElute

As condições de ligação são ajustadas com a adição de etanol para permitir a ligação ideal de RNA e DNA virais à membrana. A seguir, os lisados são transferidos para a coluna QIAamp MinElute e os ácidos nucleicos virais são adsorvidos para a membrana de gel de sílica à medida que o lisado é escurrido por pressão de vácuo. As condições de sal e de pH garantem que a proteína e outros contaminantes, que podem inibir a reação da cadeia de polimerase (polymerase chain reaction, PCR) e outras reações enzimáticas a jusante, não são retidas na membrana da QIAamp MinElute.

Remoção de contaminantes residuais

Os ácidos nucleicos permanecem ligados à membrana, enquanto os contaminantes são eficientemente lavados durante três etapas de lavagem.

Eluição de ácidos nucleicos virais

Em uma única etapa, RNA e DNA virais altamente puros são eluídos a partir da membrana da coluna QIAamp MinElute no tampão de eluição (AVE), equilibrado em temperatura ambiente. As colunas QIAamp MinElute permitem volumes de eluição de 20 µl ou 60 µl. Para aplicações posteriores 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.

Para aplicações a jusante que requerem um volume inicial maior, o volume de eluição pode ser aumentado para 60 µl. No entanto, um aumento no volume de eluição reduzirá a concentração de ácidos nucleicos no eluato.

Devido ao tampão de eluição restante retido pela membrana da coluna de centrifugação após esse processo, o volume de eluato recuperado pode ser inferior ao volume do tampão de eluição aplicado à coluna. Além disso, o volume de eluato recuperado depende da natureza da amostra.

Os ácidos nucleicos virais eluídos são coletados em tubos de eluição de (ET) e podem ser armazenados entre 2 e 8 °C por um máximo de 24 horas. Para o armazenamento a longo prazo durante mais de 24 horas, recomendamos o armazenamento de ácidos nucleicos purificados a -20 °C.

Nota: A estabilidade do eluato depende muito de vários fatores e está relacionada à aplicação a jusante específica. Ela foi avaliada para o QIAamp DSP Virus Kit em conjunto com as aplicações a jusante exemplares. O usuário é responsável por consultar as instruções de uso da aplicação a jusante específica usada em seu laboratório e/ou validar todo o fluxo de trabalho para estabelecer as condições de armazenamento adequadas.

Rendimento e qualidade dos ácidos nucleicos virais

Os rendimentos de ácidos nucleicos virais isolados de amostras biológicas se encontram, normalmente, abaixo de 1 µg. Os métodos de amplificação quantitativa são recomendados para determinação de rendimentos. Quando estiver quantificando ácidos nucleicos isolados com o protocolo QIAamp DSP Virus, lembre-se de que o RNA carreador na amostra será consideravelmente superior ao RNA viral.

O RNA carreador serve para duas finalidades: primeiro, ele aprimora a ligação dos ácidos nucleicos virais à membrana QIAamp, especialmente se houver muito poucas moléculas-alvo na amostra. Segundo, a adição de grandes quantidades de RNA carreador reduz a chance de degradação do RNA viral no caso raro de moléculas de RNase escaparem da desnaturação por sais caotrópicos e detergente no tampão de lise (AL). Se o RNA carreador não for acrescentado ao tampão de lise (AL), isso pode levar a uma recuperação reduzida de RNA e DNA virais.

O RNA carreador também pode ser incluído em alguns reagentes de controle interno de ensaios comerciais posteriores. Nestes casos, consulte as instruções de uso apropriadas do fabricante do ensaio posterior.

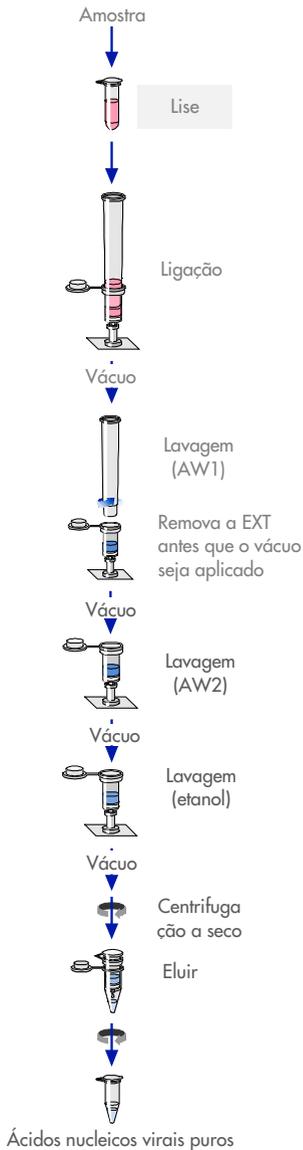
Diferentes sistemas de amplificação variam em eficiência, dependendo da quantidade total de ácidos nucleicos presentes na reação. Os eluatos deste kit contêm ácidos nucleicos virais e RNA carreador, e as quantidades de RNA carreador excederão, e muito, as quantidades de ácidos nucleicos virais. Portanto, os cálculos de quanto eluato adicionar a amplificações a jusante deverão levar em consideração a quantidade de RNA carreador adicionado. Para obter os níveis mais elevados de sensibilidade em reações de amplificação, pode ser necessário ajustar a quantidade de RNA carreador adicionado ao tampão de lise (AL).

Adição de controles internos

Usar o protocolo QIAamp DSP Virus com sistemas de amplificação comercialmente disponíveis pode exigir a introdução de um controle interno no procedimento de purificação. O RNA ou DNA de controle interno deve ser adicionado junto com o RNA carreador ao tampão de lise. Para obter uma ótima eficiência na purificação, as moléculas de controle interno devem ter mais de 200 nucleotídeos, pois as moléculas menores não são recuperadas com eficiência.

Consulte as instruções do fabricante para determinar a concentração ideal. O uso de uma concentração diferente da recomendada pode reduzir a eficiência da amplificação.

Procedimento QIAamp DSP Virus



Leia o protocolo (página 30) cuidadosamente antes de começar.
No LT, adicione 75 µl de GP, 500 µl de amostra e 500 µl de AL.

Agite em vórtex por 15 segundos.

Incube por 15 minutos a 56 °C.

Adicione 600 µl de etanol.

Agite em vórtex por 15 segundos.

Incube por 5 minutos em temperatura ambiente (15 a 25 °C).

Transfira o lisado para a coluna QIAamp MinElute com a EXT fixada.

Adicione 600 µl de AW1 reconstituído.

Remova a EXT.

Adicione 750 µl de AW2 reconstituído.

Adicione 750 µl de etanol.

Coloque a coluna QIAamp MinElute no WT.

Centrifugue por 1 minuto a 14.000 rpm.

Coloque a coluna QIAamp MinElute no WT.

Incube por 3 minutos a 56 °C.

Coloque a coluna QIAamp MinElute no ET.

Adicione 20 µl ou 60 µl de AVE.

Incube em temperatura ambiente por 3 minutos.

Centrifugue por 1 minuto a 14.000 rpm.

Resumo e explicação

O QIAamp DSP Virus Kit utiliza uma tecnologia consagrada para o isolar e purificar DNA e RNA viral simultaneamente. 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 uso 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.

Para o procedimento de vácuo, um coletor a vácuo (por ex., QIAvac 24 Plus com o QIAvac Connecting System) e uma bomba de vácuo capaz de produzir um vácuo de ~800–900 mbar (por ex., QIAGEN® Vacuum Pump) são necessários para o protocolo. Deve ser usado um Vacuum Regulator (parte do QIAvac Connecting System) para fácil monitoramento da pressão a vácuo e liberação de vácuo conveniente.

O procedimento pode ser usado para o isolamento de RNA e DNA virais de uma vasta gama de vírus de RNA e DNA. O procedimento foi concebido para evitar a contaminação cruzada entre amostras 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 serem usados em reações de amplificação ou armazenados a -20 °C para uso posterior.

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

QIAamp DSP Virus
Nº de referência
Número de preparos

60704
50

QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute columns with Wash Tube (WT)s (Colunas QIAamp MinElute com tubos de lavagem) (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 (WT)s (Tubos de lavagem) (2 ml)	WASH TUBE	50
AL	Lysis Buffer (Tampão de lise)*	LYS BUF	33 ml
AW1	Wash Buffer 1 (AW1)* (Tampão de lavagem 1) (concentrado)	WASH BUF 1 CON	19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (AW2) (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 (RNA carreador) (tampas vermelhas)	CAR RNA	310
QP	QIAGEN® Protease‡	QPROT	1 frasco
–	Instruções de uso (Manual)		1

* Contém cloridrato de guanidina. Incompatível com desinfetantes que contenham água sanitária. Consulte a página 14 para obter informações de segurança.

† Contém azida de sódio como conservante

‡ Volume de ressuspensão de 4,4 ml

Componentes do kit

Os componentes principais do kit que contêm ingredientes ativos são explicados abaixo.

Reagente	Ingredientes ativos	Concentração (w/w) [%]
QIAGEN Protease (QP)	Subtilisina	≥ 90 a ≤ 100
AL	Cloridrato de guanidina Ácido maleico	≥ 30 a < 50 $\geq 0,1$ a < 1
AW!	Cloridrato de guanidina	≥ 50 a < 70

Materiais necessários, mas não fornecidos

Reagentes adicionais

- Etanol (96 a 100%)*

Consumíveis

- Pipetas† e ponteiros de pipetas (para evitar a contaminação cruzada, recomendamos fortemente a utilização de ponteiros de pipetas com barreiras contra aerossóis)
- Luvas descartáveis

Equipamento

- Bloco de aquecimento† para lise de amostras a 56 °C para micro tubos de teste de 2,0 ml
- Microcentrífuga†
- Cilindro graduado (50 ml)
- Agitador tipo vórtex
- Sistema de vácuo QIAvac 24 Plus (n° de ref. 19413) ou equivalente†

* Não use álcool desnaturalado, que contém outras substâncias, como metanol ou metiletilcetona.

† Antes do uso, certifique-se de que os instrumentos tenham sido verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

Avisos e precauções

Esteja ciente de que poderá ser necessário consultar seus regulamentos locais para relatar incidentes graves que tenham ocorrido com o dispositivo ao fabricante e/ou seu representante autorizado e à autoridade regulatória na qual o usuário e/ou o paciente estão estabelecidos.

Para uso em diagnóstico in vitro.

Leia atentamente todas as instruções antes de utilizar o kit.

Informações de segurança

Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre use um jaleco apropriado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) aplicáveis. Elas estão disponíveis online em formato PDF conveniente e compacto em www.qiagen.com/safety, onde é possível encontrar, visualizar e imprimir a SDS para cada kit e componente do kit QIAGEN.



CUIDADO: Não adicione água sanitária ou soluções ácidas nos resíduos do preparo de amostras.

- O tampão de lise (AL) e o tampão de lavagem 1 (AW1) contêm cloridrato de guanidina, que pode formar compostos altamente reativos quando misturados com água sanitária. Se for derramado líquido contendo essas soluções tamponadas, limpe com água e detergente de laboratório adequado. Se o líquido derramado contiver agentes potencialmente infecciosos, limpe a área afetada primeiro com água e detergente de laboratório e, em seguida, com solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v).

- Se os recipientes de tampão forem danificados ou apresentarem vazamento, use luvas e óculos de proteção ao descartá-los para evitar lesões a si mesmo ou a outras pessoas.
- A QIAGEN não testou os resíduos líquidos gerados pelo procedimento QIAamp DSP Virus quanto à presença de materiais infecciosos residuais. Logo, as precauções universais (luvas, jalecos e proteção ocular) para manusear material de fonte humana potencialmente infeccioso devem ser usadas enquanto trabalha com este produto e os resíduos líquidos devem ser considerados infecciosos, e ser manuseados e descartados de acordo com os regulamentos de segurança locais.
- Espécimes e amostras são potencialmente infecciosos. Descarte os resíduos das amostras e dos ensaios de acordo com os procedimentos de segurança locais.

Informações de emergência

CHEMTREC

EUA e Canadá 1-800-424-9300

Fora dos EUA e do Canadá +1 703-527-3887

Precauções

As seguintes afirmações de risco e precauções se aplicam a componentes do QIAamp DSP Virus Kit.

Tampão de lise (AL)



Contém: cloridrato de guanidina; ácido maleico. Aviso! Pode ser prejudicial se ingerido ou inalado. Provoca irritação da pele. Pode provocar uma reação alérgica cutânea. Causa irritação grave nos olhos. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Ligue para um CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES E ENVENENAMENTOS ou um médico, se não se sentir bem. Se ocorrer irritação ou erupção cutânea: consulte um médico. Retire a roupa contaminada e lave-a antes de usá-la novamente. Descarte o conteúdo/recipiente em um local de descarte de resíduos aprovado.

Tampão de lavagem 1 (AW1)



Contém: cloridrato de guanidina. Aviso! Nocivo, se engolido ou inalado. Provoca irritação da pele. Causa irritação grave nos olhos. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Retire a roupa contaminada e lave-a antes de usá-la novamente. Descarte o conteúdo/recipiente em um local de descarte de resíduos aprovado.

QIAGEN Protease (QP)



Contém: subtilisina. Perigo! Nocivo, se engolido. Provoca irritação da pele. Causa lesões graves nos olhos. Se inalado, pode causar sintomas de asma ou alergia ou dificuldades respiratórias. Pode provocar irritação das vias respiratórias. Evite respirar poeira/fumaça/gás/névoa/vapores/spray. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Use proteção respiratória. EM CASO DE CONTATO COM OS OLHOS: Enxágue cuidadosamente com água por vários minutos. Remova lentes de contato, se presentes e fácil de serem removidas. Continue enxaguando. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Entre em contato imediatamente com um CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES E ENVENENAMENTOS ou um médico. Leve a pessoa para um local ao ar livre e deixe-a confortável para respirar.

Descarte

O resíduo contém amostras e reagentes. Esse resíduo pode conter material tóxico ou infeccioso e deve ser descartado corretamente. Consulte os regulamentos de segurança locais para ver quais são os procedimentos de descarte adequados.

Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) aplicáveis. Elas estão disponíveis online em formato PDF, no site www.qiagen.com/safety, onde é possível encontrar, visualizar e imprimir a SDS para cada kit e componente do kit QIAGEN.

Armazenamento e manuseio de reagentes

É necessário prestar atenção às datas de validade e às condições de armazenamento impressas na caixa e nos rótulos de todos os componentes. Não use componentes cuja data de validade tenha vencido ou que tenham sido incorretamente armazenados.

As colunas QIAamp MinElute devem ser armazenadas entre 2 e 8 °C após a entrega. Quando armazenadas devidamente, as colunas QIAamp MinElute permanecem estáveis até o fim do prazo de validade indicado na caixa do kit.

Nota: Para garantir que os componentes do kit de diferentes kits não são misturados, rotule as colunas QIAamp MinElute com o respectivo número de lote do kit.

Todos os tampões podem ser armazenados em temperatura ambiente (15 a 25 °C) até o fim do prazo de validade indicado na caixa do kit.

O RNA carreador liofilizado pode ser armazenado em temperatura ambiente até a data de validade na caixa do kit.

A QIAGEN Protease (QP) liofilizada pode ser armazenada em temperatura ambiente até o fim do prazo de validade sem que isto afete seu desempenho.

Estabilidade em uso

O RNA carreador só pode ser dissolvido em tampão de eluição (AVE); o RNA carreador dissolvido deve ser adicionado imediatamente ao tampão de lise (AL), tal como descrito na página 24. Esta solução deve ser preparada na hora, mantendo-se estável entre 2 a 8 °C por até 48 horas. As partes não usadas do RNA carreador dissolvidas em tampão de eluição (AVE) devem ser congeladas em alíquotas a -20 °C.

A QIAGEN Protease (QP) reconstituída em solvente de protease (PS) mantém-se estável por até 1 ano, desde que seja armazenada entre 2 e 8 °C, mas apenas até o fim do prazo de validade. Deve-se evitar manter a solução de estoque da QIAGEN Protease (QP) em temperatura ambiente durante períodos de tempo prolongados.

O tampão de lavagem 1 (AW1) reconstituído e o tampão de lavagem 2 (AW2) reconstituído permanecem estáveis por até 1 ano quando armazenados em temperatura ambiente, mas apenas até o fim do prazo de validade indicado na caixa do kit.

Transporte, armazenamento e manuseio de espécimes

Nota: A estabilidade de amostra depende altamente de vários fatores e está relacionada à aplicação a jusante específica. Ela foi avaliada juntamente com as aplicações a jusante exemplares. O usuário é responsável por consultar as instruções de uso da aplicação a jusante específica usada em seu laboratório e/ou validar todo o fluxo de trabalho para estabelecer as condições de armazenamento adequadas.

Para obter recomendações gerais sobre coleta, transporte e armazenamento, consulte a diretriz aprovada MM13-A do CLSI "Coleta, transporte, preparação e armazenamento de espécimes para métodos moleculares". Além disso, as instruções do fabricante, quanto ao dispositivo de coleta de amostras selecionado, devem ser seguidas durante o preparo, armazenamento, transporte e manuseio geral de amostras.

O procedimento de purificação é otimizado para uso com amostras de plasma e soro humanos. As amostras de sangue tratadas com EDTA ou citrato como anticoagulante podem ser utilizadas para o preparo do plasma. As amostras devem ser frescas ou congeladas, desde que sejam congeladas e descongeladas apenas uma vez. Descongele as amostras congeladas com uma leve agitação para garantir uma mistura homogênea.

Após a coleta e a centrifugação, o plasma ou o soro podem ser armazenados entre 2 e 8 °C por até 6 horas. Para o armazenamento prolongado, recomenda-se o congelamento em alíquotas a -80 °C a -20 °C. As amostras congeladas de plasma ou soro não devem ser descongeladas mais de uma vez. O congelamento e o descongelamento recorrentes levam à desnaturação e à precipitação de proteínas, resultando em títulos virais reduzidos e, portanto, em produções reduzidas de ácidos nucleicos virais. Além disso, os crioprecipitados formados durante o congelamento e o descongelamento irão obstruir a membrana da coluna QIAamp MinElute.

Se os crioprecipitados estiverem visíveis, eles devem ser peletizados por centrifugação a cerca de 6800 x g por 3 minutos. O sobrenadante clarificado deve ser aspirado e processado imediatamente sem perturbar o pellet. Inicie o procedimento de purificação imediatamente. A centrifugação a força g baixa não reduz os títulos virais.

Nota: De acordo com estudos de interferência exemplares para o QIAamp DSP Virus Kit e, também, com a ISO 20186-2:2019(E), a heparina dos tubos de coleta de sangue pode afetar a pureza dos ácidos nucleicos isolados e um possível carryover nos eluatos pode causar inibições em algumas aplicações a jusante. Portanto, recomendamos o uso de amostras de sangue tratadas com EDTA ou citrato como anticoagulante.

Notas importantes

Pontos importantes antes de começar

- Assim que receber o kit, verifique se há algum dano nos respectivos componentes. Se os blisters ou os frascos dos tampões estiverem danificados, entre em contato com a Assistência Técnica da QIAGEN ou com o distribuidor local. Em caso de derramamento de líquidos, consulte "Avisos e precauções" (página 14). Não use componentes de kits danificados, pois seu uso pode prejudicar o desempenho do kit.
- Use sempre equipamentos sem RNase.
- Troque sempre as ponteiros das pipetas entre as transferências de líquidos. Para minimizar a contaminação cruzada, recomenda-se o uso de ponteiros de pipeta com barreira contra aerossóis.
- Sempre use luvas descartáveis e verifique regularmente se elas não estão contaminadas com o material da amostra.
- Descarte as luvas se ficarem contaminadas e, pelo menos, em todos os passos nos quais é visualizado um símbolo com a forma de uma luva. 
- Para minimizar a contaminação cruzada, abra apenas um tubo por vez.
- Após todas as etapas de agitação em vórtex pulsador, centrifugue brevemente os tubos da microcentrífuga para remover as gotas de dentro da tampa.
- Todas as etapas de centrifugação são realizadas em temperatura ambiente (15 a 25 °C).
- O usuário deve garantir que a rastreabilidade das amostras é mantida durante todo o procedimento.
- Não use componentes de outros kits com o kit que estiver usando no momento, a menos que os números de lote sejam idênticos.
- Evite a contaminação microbiana dos reagentes do kit.
- Para minimizar o risco de infecção por material potencialmente infeccioso, recomendamos trabalhar em condições de fluxo de ar laminar até que as amostras sejam lisadas.

- 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.
- Este kit sempre deve ser usado por uma equipe treinada em práticas laboratoriais de diagnóstico in vitro.

Manuseio das colunas QIAamp MinElute

Dada a sensibilidade das tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos, é necessário tomar as seguintes precauções ao manusear colunas QIAamp MinElute para evitar a contaminação cruzada entre os preparos de amostras:

- Aplique cuidadosamente a amostra ou solução à coluna QIAamp MinElute. Pipete a amostra na coluna QIAamp MinElute sem molhar a borda da coluna.
- Troque sempre as ponteiros das pipetas entre todas as transferências de líquidos. Recomenda-se o uso de ponteiros de pipetas com barreira contra aerossóis.
- Evite o contato da membrana da QIAamp MinElute com a ponteira da pipeta.
- Abra somente uma coluna QIAamp MinElute de cada vez e tome cuidado para evitar a geração de aerossóis.

Preparo de reagentes e tampões

Preparo de RNA

Ao preparar o RNA viral, trabalhe rapidamente durante as etapas manuais do procedimento e leia o Anexo na página 46 antes de começar.

Preparo da QIAGEN Protease (QP)

Adicione todo o conteúdo do frasco contendo 4,4 ml de solvente de protease (PS) ao frasco de QIAGEN Protease (QP) liofilizada e misture cuidadosamente. Para evitar a formação de espuma, misture invertendo o frasco várias vezes. Certifique-se de que a QIAGEN Protease (QP) esteja completamente dissolvida.



Não adicione QIAGEN Protease (QP) diretamente ao tampão de lise (AL)*.

Adição de RNA carreador e controle interno no tampão de lise (AL)*

Recomenda-se a utilização de um controle interno durante a utilização do QIAamp DSP Virus Kit em conjunto com sistemas de amplificação de diagnóstico. Consulte mais informações nas instruções do fabricante. O controle interno e o RNA carreador reconstituído devem ser adicionados ao tampão de lise (AL) e cuidadosamente misturados, invertendo o tubo 10 vezes. Para evitar a formação de espuma, não centrifugue. Se o controle interno for usado, reduza o volume do tampão de lise (AL) adequadamente (consulte a Tabela 1 para obter mais detalhes).

Consulte as instruções do fabricante para determinar a concentração ideal do controle interno. O uso de uma concentração diferente da recomendada pode gerar resultados incorretos. Ao calcular a quantidade correta de controle interno a utilizar, é necessário considerar o volume inicial da amostra e o volume de eluição. Lembre-se que o QIAamp DSP Virus Kit utiliza um volume de amostra inicial de 500 µl.

Para preparar a solução de RNA carreador, adicione 310 µl de tampão de eluição (AVE) ao tubo que contém 310 µg de RNA carreador liofilizado para obter uma solução de 1 µg/µl. Dissolva completamente o RNA carreador, divida-o em alíquotas no tamanho mais conveniente e armazene-o a -20 °C. Não congele–descongele as alíquotas do RNA carreador mais do que 3 vezes.



O RNA carreador não se dissolve no tampão de lise (AL). Ele ser dissolvido primeiro no tampão de eluição (AVE) e depois acrescentado ao tampão de lise (AL). Assegure que o RNA carreador seja completamente dissolvido no volume correto do tampão de eluição (AVE) antes de o misturar com o tampão de lise (AL).

* Contém sal caotrópico. Tome as medidas de segurança apropriadas em laboratório e use luvas durante o manuseio.
Incompatível com desinfetantes que contenham água sanitária. Consulte a página 14 para obter informações de segurança.

Calcule o volume da mistura de tampão de lise (AL)/RNA carreador necessário por lote de amostras selecionando o número de amostras que serão processadas simultaneamente a partir da Tabela 1. Os volumes são calculados utilizando o seguinte cálculo de amostras:

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

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

onde: **n** = número de amostras a serem processadas simultaneamente

y = volume calculado de tampão de lise (AL)

z = volume de RNA carreador/tampão de eluição (AVE) a adicionar ao tampão de lise (AL)

Misture, com cuidado, invertendo o tubo 10 vezes. Para evitar a formação de espuma, não centrifugue.

Tabela 1. Volumes de tampão de lise (AL) e de RNA carreador/tampão de eluição (AVE) necessários para o procedimento QIAamp DSP Virus*

Nº de amostras	Vol. AL *(ml)	Vol. RNA carreador/AVE (µl)	Nº de amostras	Vol. AL *(ml)	Vol. RNA carreador/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



O procedimento de preparo de amostras é otimizado para 5,6 µg de RNA carreador por amostra. Se for demonstrado que menos RNA carreador é melhor para o seu sistema de amplificação, transfira apenas a quantidade necessária de RNA carreador dissolvido para os tubos que contêm tampão de lise (AL). Para cada micrograma de RNA carreador necessário por preparo, adicione 5 µl de Buffer AVE-RNA carreador dissolvido por mililitro de tampão de lise (AL). O uso de menos de 5,6 µg de RNA carreador por amostra deve ser validado para cada tipo específico de amostra e ensaio posterior.

* Se o controle interno for usado, reduza o volume do tampão de lise (AL) adequadamente.

Preparo do tampão de lavagem 1 (AW1)*

Utilizando um cilindro graduado, adicione 25 ml de etanol (96 a 100%) ao frasco que contém 19 ml de tampão de lavagem 1 (AW1) concentrado. Marque a caixa de seleção no rótulo para indicar que o etanol foi adicionado. Armazene o tampão de lavagem 1 (AW1) reconstituído em temperatura ambiente (15–25 °C).



Sempre misture o tampão de lavagem 1 (AW1) reconstituído invertendo o frasco várias vezes antes de iniciar o procedimento.

Preparo do tampão de lavagem 2 (AW2)†

Utilizando um cilindro graduado, adicione 30 ml de etanol (96 a 100%) ao frasco que contém 13 ml de tampão de lavagem 2 (AW2) concentrado. Marque a caixa de seleção no rótulo para indicar que o etanol foi adicionado. Armazene o tampão de lavagem 2 (AW2) reconstituído em temperatura ambiente (15–25 °C).



Sempre misture o tampão de lavagem 2 (AW2) reconstituído invertendo o frasco várias vezes antes de iniciar o procedimento.

Preparo do tampão de eluição (AVE)

Junto com o kit, são fornecidos quatro tubos de tampão de eluição (AVE). Cuidado para não contaminar o tampão com RNases. Caso realize 4 procedimentos de purificação ou menos usando um único kit, recomendamos o descarte do tubo do tampão de eluição (AVE) no final de cada procedimento.

* Contém sal castrópico. Tome as medidas de segurança apropriadas em laboratório e use luvas durante o manuseio.

Incompatível com desinfetantes que contenham água sanitária. Consulte a página 14 para obter informações de segurança.

† Contém azida de sódio como conservante.

Montagem do sistema de vácuo QIAvac 24 Plus

Certifique-se de que o extensor da coluna (EXT), a coluna QIAamp MinElute, o VacConnector (VC) e a VacValve estão corretamente instalados (consulte a Figura 1).

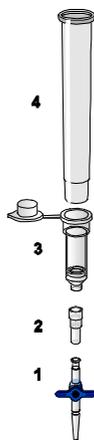


Figura 1. Montagem dos componentes do QIAamp DSP Virus Kit para o processamento de amostras com vácuo:

- | | |
|--|-------------------------------|
| 1. VacValve (fornecida com o sistema de vácuo) | 3. Coluna QIAamp MinElute |
| 2. VacConnector (VC) | 4. Extensores da coluna (EXT) |

Recomendamos rotular os tubos de lise (LT), os tubos de eluição (ET), e as colunas QIAamp MinElute para uso no sistema de vácuo QIAvac 24 Plus de acordo com o esquema na Figura 2 para evitar a mistura de amostras. Essa figura pode ser fotocopiada e rotulada com os nomes das amostras.

Data: _____

Operador: _____

ID da execução: _____

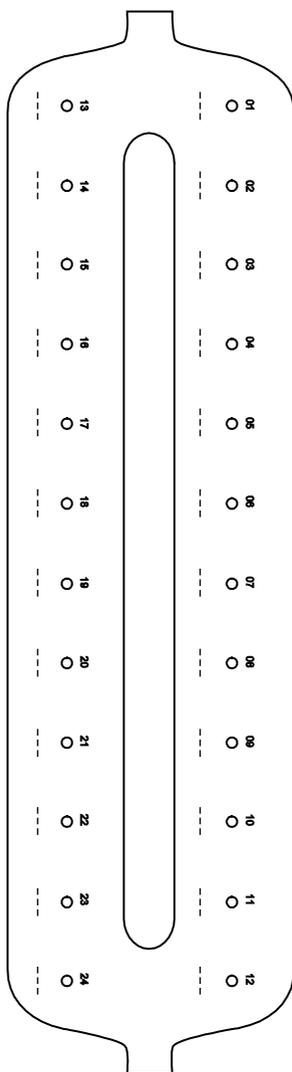


Figura 2. Esquema de rotulagem dos tubos de lise (LT), dos tubos de eluição (ET) e das colunas QIAamp MinElute para uso no sistema de vácuo QIAvac 24 Plus.

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

Para isolar e purificar ácidos nucleicos virais de 500 µl de plasma e soro tratados com EDTA ou citrato.

O que fazer antes de começar

- Equilibre as amostras a temperatura ambiente (15 a 25 °C) e certifique-se de que elas estejam bem misturadas.
- Certifique-se de que todos os reagentes e as colunas QIAamp MinElute (em bolhas fechadas) estão equilibrados de acordo com a temperatura ambiente.
- Coloque um bloco de aquecimento a 56 °C, para usá-lo nos passos 4 e 17.
- Certifique-se de que o tampão de lavagem 1 (AW1) o tampão de lavagem 2 (AW2) e a QIAGEN Protease (QP) tenham sido preparados de acordo com as instruções fornecidas em "Pontos importantes antes de começar", na página 22.
- Em caso de formação de um precipitado no tampão de lise (AL), dissolva-o por meio de incubação a 56 °C.
- Adicione o RNA carreador reconstituído em tampão de eluição (AVE) ou controle interno ao tampão de lise (AL), de acordo com as instruções na página 24.
- Se possível, utilize um tampão de eluição (AVE) novo a cada procedimento (são fornecidos 4 tubos).
- Para minimizar a contaminação cruzada, insira um VacConnector (VC) em cada adaptador luer do sistema de vácuo.
- Os procedimentos de controle de qualidade na QIAGEN incluem testes funcionais de aprovação de kits para todos os lotes individuais de kits. Portanto, não misture reagentes de lotes de kits diferentes e não combine reagentes individuais de diferentes lotes de reagentes.
- Certifique-se de que o frasco de resíduos do sistema de vácuo esteja vazio e de que todas as conexões estejam ligadas de forma correta.

- Para obter detalhes sobre o funcionamento do sistema de vácuo, especialmente no que se refere à manutenção, consulte o manual fornecido.

Procedimento

1. Pipete 75 µl de QIAGEN Protease (QP) em um tubo de lise (LT).



Verifique o prazo de validade da protease reconstituída antes de usá-la.

2. Adicione 500 µl de plasma ou soro ao tubo de lise (LT).
3. Adicione 500 µl de tampão de lise (AL) (contendo 11,2 µg/ml de RNA carreador) ao tubo de lise (LT), feche a tampa e misture por agitação em vórtex pulsador por ≥15 segundos.

Para garantir uma lise eficiente, é essencial que a amostra e o tampão de lise (AL) sejam completamente misturados até obter uma solução homogênea.



O tampão de lise (AL) contém controle interno. Como o tampão de lise (AL) apresenta uma elevada viscosidade, certifique-se de que seja adicionado o volume correto de tampão de lise (AL) pipetando cuidadosamente.



Não adicione QIAGEN Protease (QP) diretamente ao tampão de lise (AL).

4. Incube a 56 °C por 15 minutos.
5. Centrifugue o tubo de lise (LT) por ≥5 segundos à velocidade máxima para remover gotas do interior da tampa.



6. Troque de luvas e abra cuidadosamente o tubo de lise (LT).
7. Adicione 600 µl de etanol (96 a 100%) ao tubo de lise (LT), feche a tampa e misture por agitação em vórtex pulsador por impulsos por ≥15 segundos. Incube em temperatura ambiente por 5 minutos (15 a 25 °C).
8. Centrifugue o tubo de lise (LT) por ≥5 segundos à velocidade máxima para remover gotas do interior da tampa.

9. Insira a coluna QIAamp MinElute dentro do VacConnector (VC) no sistema de vácuo (consulte a Figura 1, na página 28). Insira um extensor da coluna (EXT) na coluna QIAamp MinElute aberta.



Guarde o tubo de lavagem (WT) para a centrifugação a seco no passo 16.



10. Troque de luvas e abra apenas um tubo de cada vez.

11. Aplique cuidadosamente todo o lisado da etapa 7 no extensor da coluna (EXT) da coluna QIAamp MinElute sem molhar a borda.

12. Ligue a bomba de vácuo. Assim que o lisado tiver passado através da coluna QIAamp MinElute, abra a válvula do sistema de vácuo e libere o vácuo.

Em caso de processamento de várias colunas QIAamp MinElute mesmo tempo, recomendamos fechar a VacValve de cada coluna após o lisado ter passado através dela para reduzir a duração desta etapa de vácuo.



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



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

13. Aplique 600 µl do tampão de lavagem 1 (AW1) à coluna QIAamp MinElute. Remova cuidadosamente e descarte o extensor da coluna (EXT) e feche a válvula do sistema de vácuo. Assim que o tampão de lavagem 1 (AW1) tiver passado através da coluna QIAamp MinElute, abra a válvula e libere o vácuo.



Para evitar contaminação cruzada, certifique-se de que os extensores da coluna (EXT) removidos não passem sobre as colunas QIAamp MinElute adjacentes.

14. Aplique 750 µl do tampão de lavagem 2 (AW2) na coluna QIAamp MinElute sem molhar a borda. Deixe a tampa da coluna aberta e feche a válvula do sistema de vácuo. Assim que o tampão de lavagem 2 (AW2) tiver passado através da coluna QIAamp MinElute, abra a válvula e libere o vácuo.

15. Aplique 750 µl de etanol (96 a 100%) na coluna QIAamp MinElute sem molhar a borda. Deixe a tampa da coluna aberta e feche a válvula do sistema de vácuo. Assim que o etanol tiver passado através da coluna QIAamp MinElute, abra a válvula e libere o vácuo.



Use ponteiras de pipeta com barreira contra aerossóis para aplicar etanol na coluna QIAamp MinElute.

16. Feche a tampa da coluna QIAamp MinElute, remova-a do sistema de vácuo e descarte o VacConnector (VC). Coloque a coluna QIAamp MinElute no tubo de lavagem (WT) salvo na etapa 9 e centrifugue à velocidade máxima (aproximadamente 20.000 x g ou 14.000 rpm) por 1 minuto para secar completamente a membrana. Descarte o tubo de lavagem (WT) que contém o filtrado.



A omissão da centrifugação a seco pode resultar na inibição do ensaio posterior.

17. Coloque a coluna QIAamp MinElute em um novo tubo de lavagem (WT) e incube com a tampa aberta a 56 °C por 3 minutos para evaporar qualquer líquido restante.

18. Coloque a coluna QIAamp MinElute em um novo tubo de eluição (ET) e descarte o tubo de lavagem (WT). Abra cuidadosamente a tampa da coluna QIAamp MinElute e aplique 20 µl ou 60 µl de tampão de eluição (AVE) (dependendo do ensaio posterior) no centro da membrana.



É importante usar um novo tubo de eluição para evitar a contaminação em tampões de lavagem residuais que podem levar à inibição do ensaio posterior.



Dispensar o tampão de eluição no centro da membrana é especialmente importante para volumes de eluição menores para garantir a recuperação ideal dos ácidos nucleicos e do tampão de eluição.



O volume de eluição pode ser adaptado de acordo com os requisitos da aplicação a jusante. Lembre-se de que o volume de eluato recuperado pode ser inferior ao volume do tampão de eluição aplicado à coluna, devido ao tampão de eluição restante retido pela membrana da coluna de centrifugação após esse processo.



Certifique-se de que o tampão de eluição seja equilibrado em temperatura ambiente.

19. Feche a tampa e incube a temperatura ambiente (15 a 25 °C) por ≥ 3 minutos.

Centrifugue à velocidade máxima (aproximadamente 20.000 x g ou 14.000 rpm) por 1 minuto para eluir os ácidos nucleicos virais.



Posicione as tampas do tubo de eluição de modo a apontarem em uma direção oposta ao sentido do rotor (por ex., se o rotor girar no sentido horário, oriente as tampas no sentido anti-horário).



Siga o procedimento de manutenção do sistema de vácuo após realizar este protocolo (para obter mais detalhes, consulte o manual fornecido com o sistema de vácuo).

Controle de qualidade

De acordo com o sistema da gestão de qualidade total da QIAGEN, cada lote do QIAamp DSP Virus Kit é testado em relação a especificações predeterminadas para garantir uma qualidade constante do produto.

Limitações

O desempenho do sistema foi estabelecido em estudos de avaliação de desempenho que purificaram os ácidos nucleicos virais de amostras de plasma e soro humanos.

É responsabilidade do usuário verificar o desempenho do sistema para quaisquer procedimentos usados em seu laboratório que não abrangidos pelos estudos de avaliação de desempenho da QIAGEN.

Para minimizar o risco de um impacto negativo nos resultados do diagnóstico, devem ser usados os controles adequados para aplicações a jusante. Quaisquer resultados de diagnóstico gerados devem ser interpretados em conjunto com outros resultados clínicos ou laboratoriais.

Características de desempenho

As características de desempenho aplicáveis estão disponíveis na guia de recursos da página de produto em www.qiagen.com.

Guia de solução de problemas

Este guia de solução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para obter mais informações, consulte também a página de Perguntas frequentes (Frequently Asked Questions, FAQ) no nosso Centro de Suporte Técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Os cientistas da Assistência Técnica da QIAGEN estão sempre prontos para responder quaisquer perguntas que você possa ter sobre as informações e/ou os protocolos neste manual ou sobre as tecnologias de amostragem e ensaio (para obter informações de contato, acesse www.qiagen.com).

Comentários e sugestões

Manuseio geral

- a) Obstrução de ponteiras da pipeta durante a transferência de amostras
- As amostras congeladas não foram misturadas corretamente após o descongelamento. Descongele as amostras congeladas com uma leve agitação para garantir uma mistura homogênea.
- Os crioprecipitados formados durante o congelamento e o descongelamento irão obstruir a membrana do QIAamp MinElute. No caso de os crioprecipitados serem visíveis, limpe a amostra com centrifugação durante 5 minutos a 16.000 x g.
- b) Coluna QIAamp MinElute entupida
- Se a vazão for reduzida, o tempo de vácuo poderá ser prolongado.
- Em alternativa, feche a VacValve, se usada, e remova, com cuidado, o conjunto extensor da coluna-VacConnector-VacValve da coluna do QIAamp MinElute, sem perder nenhum dos lisados no extensor de coluna.
- Remova a coluna QIAamp MinElute do coletor de vácuo, coloque-a em um tubo de lavagem (WT) de 2 ml e gire-o a toda velocidade, até que a amostra tenha passado completamente pela membrana. Substitua o conjunto extensor-VacConnector-VacValve que contém o lisado remanescente. Ligue a bomba de vácuo, abra a VacValve e continue a carregar o lisado remanescente.
- Repita o procedimento acima, se a coluna QIAamp MinElute continuar a entupir.
- Os crioprecipitados formados durante o congelamento e o descongelamento irão obstruir a membrana da coluna do QIAamp MinElute. No caso de os crioprecipitados serem visíveis, limpe a amostra com centrifugação durante 5 minutos a 16.000 x g.

Comentários e sugestões

- Usar etanol resfriado a gelo durante a lise pode ajudar a diminuir o risco de obstrução da membrana. Além disso, é essencial adicionar aos tampões para lise na ordem correta descrita acima. Não adicione QIAGEN Protease (QP) diretamente ao tampão de lise (AL).
- c) Precipitado se formou no tampão de lise Dissolva por incubação do tampão de lise (AL) a 56 °C.
- d) Volumes de eluição variáveis O volume de eluato recuperado depende da natureza da amostra.
Devido ao tampão de eluição restante retido pela membrana da coluna de centrifugação após esse processo, o volume de eluato recuperado pode ser inferior ao volume do tampão de eluição aplicado à coluna.
Aplique o tampão de eluição ao centro da membrana. Dispensar o tampão de eluição no centro da membrana é especialmente importante para volumes de eluição menores para garantir a recuperação ideal dos ácidos nucleicos e do tampão de eluição.
- e) Pressão de vácuo de ~800 a ~900 mbar não atingida O coletor de vácuo não está bem fechado. Pressione para baixo a tampa do coletor de vácuo, depois de o vácuo ter sido ligado. Verifique se a pressão de vácuo é atingida. A gaxeta da tampa do QIAvac está desgastada. Verifique, visualmente, a vedação do coletor e substitua, se necessário.
As VacValves se desgastaram. Remova todas as VacValves e insira VacConnectors diretamente nas extensões luer. Insira as colunas QIAamp MinElute nos VacConnectors, feche a tampa das colunas e ligue o vácuo. Verifique se a pressão de vácuo é atingida. Substitua as VacValves, se necessário.
A conexão com a bomba de vácuo está vazando. Feche toda a extensão luer com tampas luer e ligue a bomba de vácuo. Verifique se a pressão do vácuo está estável, depois de a bomba ter sido ligada (e a válvula do Vacuum Regulator está fechada). Troque as conexões entre a bomba e o coletor do aspirador, se necessário.
Se a pressão de vácuo ainda não tiver sido atingida, substitua a bomba de vácuo por uma mais forte.

Comentários e sugestões

O DNA não tem bom desempenho em reações a jusante

- a) Lise incompleta da amostra
- Se a QIAGEN Protease (QP) tiver sido submetida a temperatura elevada durante tempo prolongado, ela poderá perder a atividade. Repita o procedimento usando novas amostras e a QIAGEN Protease (QP) fresca.
- Certifique-se de dissolver a QIAGEN Protease (QP) com solvente de protease de acordo com as instruções acima. Para evitar a formação de espuma, misture invertendo o frasco várias vezes. Certifique-se de que a QIAGEN Protease (QP) esteja completamente dissolvida. Não adicione QIAGEN Protease (QP) diretamente ao tampão de lise (AL).
- Para garantir uma lise eficiente, é essencial que a amostra e o tampão de lise (AL) sejam completamente misturados até obter uma solução homogênea. Como o tampão de lise (AL) apresenta uma elevada viscosidade, certifique-se de que seja adicionado o volume correto de tampão de lise (AL) pipetando cuidadosamente e usando uma pipeta apropriada.
- b) Etanol de baixa porcentagem usado, em vez de etanol entre 96–100%
- Repita o procedimento de purificação com novas amostras e etanol entre 96–100%. Não use álcool desnaturado, que contém outras substâncias, como metanol ou metiletilcetona.
- c) Tampão de lavagem 1 (AW1) ou tampão de lavagem 2 (AW2) preparado incorretamente
- Certifique-se de que os concentrados de tampão de lavagem 1 (AW1) e tampão de lavagem 2 (AW2) foram diluídos com o volume correto de etanol de 96 a 100% e misturado invertendo o frasco várias vezes antes de iniciar o procedimento.

Comentários e sugestões

- d) As amostras de plasma e soro não foram preparadas, armazenadas ou misturadas corretamente
- O procedimento de purificação é otimizado para uso com amostras de plasma e soro humanos. As amostras de sangue tratadas com EDTA ou citrato como anticoagulante podem ser utilizadas para o preparo do plasma. Após a coleta e a centrifugação, o plasma ou o soro podem ser armazenados entre 2 e 8 °C por até 6 horas. Para o armazenamento prolongado, recomenda-se o congelamento em alíquotas a -80 °C a -20 °C.
- As amostras congeladas de plasma ou soro não devem ser descongeladas mais de uma vez. O congelamento e o descongelamento recorrentes levam à desnaturação e à precipitação de proteínas, resultando em títulos virais reduzidos e, portanto, em produções reduzidas de ácidos nucleicos virais.
- Descongele as amostras congeladas com uma leve agitação para garantir uma mistura homogênea.
- e) Pouco ou nenhum DNA no eluato
- Reduza o volume de eluição ou aumente a quantidade de eluato adicionado à reação, se possível.
- f) Volume de eluição inadequado usado
- Determine o volume máximo de eluato adequado para sua aplicação a jusante. Reduza ou aumente o volume de eluato adicionado à aplicação a jusante adequadamente. O volume de eluição pode ser adaptado proporcionalmente. A eluição com valores menores de Buffer AVE leva a concentrações mais elevadas de ácidos nucleicos.
- g) Carryover de potencial inibidor
- Certifique-se de que efetua a etapa de centrifugação a seco antes da eluição para prevenir potencial inibição do ensaio posterior.
- É importante usar um novo tubo de eluição para evitar a contaminação em tampões de lavagem residuais que podem levar à inibição do ensaio posterior.
- De acordo com estudos de interferência exemplares para o QIAamp DSP Virus Kit e, também, com a ISO 20186-2:2019(E), a heparina dos tubos de coleta de sangue pode afetar a pureza dos ácidos nucleicos isolados e um possível carryover nos eluatos pode causar inibições em algumas aplicações a jusante. Portanto, recomendamos o uso de amostras de sangue tratadas com EDTA ou citrato como anticoagulante.

Comentários e sugestões

- h) RNA carreador degradado/preparado incorretamente
- RNA carreador serve para duas finalidades: primeiro, ele aprimora a ligação dos ácidos nucleicos virais à membrana QIAamp, especialmente se houver muito poucas moléculas-alvo na amostra. Segundo, a adição de grandes quantidades de RNA carreador reduz a chance de degradação do RNA viral no caso raro de moléculas de RNase escaparem da desnaturação por sais caotrópicos e detergente no tampão de lise (AL).
- Se o RNA carreador não for acrescentado ao tampão de lise (AL), isso pode levar a uma recuperação reduzida de RNA e DNA virais.
- RNA carreador só pode ser dissolvido em Buffer AVE; o RNA carreador dissolvido deve ser adicionado imediatamente ao tampão de lise (AL).
- RNA carreador também pode ser incluído em alguns reagentes de controle interno de ensaios comerciais posteriores. Nestes casos, consulte as instruções de uso apropriadas do fabricante do ensaio posterior.

Símbolos

Os seguintes símbolos são exibidos nas instruções de uso ou na embalagem e no rótulo:

Símbolo	Definição do símbolo
	Contém reagentes suficientes para <N> reações
	Data de validade
	Este produto atende aos requisitos do Regulamento Europeu 2017/746 sobre dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Número de referência
	Número de lote
	Número do material (isto é, etiquetagem do componente)
	Componentes
	Volume
	Contém
	Número
	Número global de item comercial
	R representa a revisão das Instruções de uso e n representa o número de revisão
	Limites de temperatura

Símbolo	Definição do símbolo
	Fabricante
	Consulte as instruções de uso
	Conservar ao abrigo da luz solar
	Aviso/cuidado
	Na chegada
	Nota importante
	Trocar luvas após cada passo do protocolo com este símbolo
	Abra na entrega; conserve as colunas QIAamp MinElute entre 2 e 8 °C
	Anote a data atual depois de adicionar etanol ao frasco
	Adição
	Liofilizado

Símbolo

Definição do símbolo

RCNS

Reconstituir em

EtOH

Etanol

GuHCl

Cloridrato de guanidina

MALEIC ACID

Ácido maleico

SUBT

Subtilisina



Leva a

UDI

Identificador único do dispositivo

Anexo

Manuseio de RNA

As ribonucleases (RNases) são enzimas muito estáveis e ativas que, geralmente, não precisam de cofatores para funcionar. Como as RNases são difíceis de desativar e uma quantidade mínima é suficiente para destruir o RNA, não use utensílios de plástico ou de vidro sem primeiro eliminar a possível contaminação por RNase. É necessário tomar cuidado para evitar a introdução inadvertida de RNases na amostra de RNA durante ou após o procedimento de isolamento. Para criar e manter um ambiente sem RNase, as seguintes precauções deverão ser tomadas durante o pré-tratamento e o uso de vasos e soluções descartáveis e não descartáveis ao trabalhar com RNA.

Manuseio geral

A técnica asséptica e microbiológica adequada deve sempre ser usada ao trabalhar com RNA. Partículas das mãos e de pó podem carregar bactérias e mofo e são as fontes mais comuns de contaminação por RNase. Sempre use luvas de látex ou vinil durante o manuseio de reagentes e amostras de RNA, para evitar contaminações por RNase com origem na superfície da pele ou em poeira do equipamento de laboratório. Troque as luvas com frequência e mantenha os tubos fechados.

Informações sobre pedidos

Produto	Conteúdo	Nº de ref.
QIAamp DSP Virus Kit (50)	Para 50 preparos: colunas QIAamp MinElute, tampões, reagentes, tubos, extensores da coluna, VacConnectors	60704
Acessórios		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold	Coletor de vácuo para processamento de 1–24 colunas de centrifugação: coletor de vácuo QIAvac 24 Plus, plugues luer, acoplamentos rápidos	19413
Vacuum Pump	Bomba de vácuo universal	84020
VacConnectors	500 conectores descartáveis para uso com colunas de centrifugação do QIAamp em conectores luer	19407
VacValves	24 válvulas para uso com o QIAvac 24 e QIAvac 24 Plus	19408
Vacuum Regulator	Vacuum Regulator	19530
QIAvac Connecting System	Sistema para conectar o coletor de vácuo com a bomba de vácuo: inclui bandeja, frascos de resíduos, acoplamentos, válvulas, medidor e 24 VacValves.	19419

Para obter informações de licenciamento atualizadas e isenções de responsabilidade específicas do produto, consulte as Instruções de uso do kit QIAGEN correspondente. As Instruções de uso do kit QIAGEN estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados à assistência técnica da QIAGEN ou ao seu distribuidor local.

Histórico de revisões do documento

Revisão	Descrição
R1, junho de 2022	<p>Versão 2, Revisão 1</p> <ul style="list-style-type: none">● Atualização para a versão 2 do kit para conformidade com o IVDR● Atualização das seções Uso previsto e Limitações● Atualização de Descrição e princípio● Atualização de Materiais fornecidos (adição de ingredientes ativos) e Materiais necessários, mas não fornecidos● Atualização de Avisos e precauções (Adição de informações de emergência e da seção Descarte)● Atualização de Armazenamento e manuseio de reagentes● Atualização de Coleta, armazenamento e manuseio de espécimes● Atualização de Notas importantes e Procedimento● Atualização de Características de desempenho● Adição da seção Anexo● Adição do Guia de solução de problemas● Atualização da seção Símbolos● Adição das Informações sobre pedidos

Esta página foi deixada em branco intencionalmente

Esta página foi deixada em branco intencionalmente

Esta página foi deixada em branco intencionalmente

Contrato de licença limitada para o QIAamp® DSP Virus Kit

O uso desse produto implica a concordância por parte de qualquer comprador ou usuário do produto com os seguintes termos:

1. O produto deverá ser usado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e com estas Instruções de uso e recorrendo ao uso exclusivo de componentes contidos no painel. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incorporar os componentes deste painel a quaisquer componentes não incluídos nele, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, nestas Instruções de uso e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com. Alguns desses protocolos adicionais foram fornecidos pelos usuários da QIAGEN para os usuários da QIAGEN. Esses protocolos não foram testados por completo nem otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não garante nem fornece garantias de que eles não infrinjam os direitos de terceiros.
2. Com exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este painel e/ou o seu uso não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este painel e seus componentes estão licenciados para uso único e não podem ser reutilizados, reconstruídos ou revendidos.
4. A QIAGEN renuncia especificamente a quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, com exceção das expressamente indicadas.
5. O comprador e o usuário do painel concordam em não realizar nem permitir que outra pessoa realize qualquer etapa que possa levar a ou facilitar qualquer um dos atos proibidos acima. A QIAGEN poderá fazer cumprir as proibições deste Contrato de Licença Limitada em qualquer Tribunal e recuperará todos os seus custos de investigação e de Tribunal, incluindo honorários de advogados, em qualquer ação destinada a fazer cumprir este Contrato de Licença Limitada ou qualquer um de seus direitos de propriedade intelectual relativos ao painel e/ou seus componentes.

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

Marcas registradas: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp® (QIAGEN Group). Os nomes registrados, as marcas comerciais etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcados especificamente como tal, devem ser considerados protegidos pela lei.

1127541PTBR 06/2022 HB-3032-001 © 2022 QIAGEN, todos os direitos reservados.

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