

# Manual do EZ1<sup>®</sup> DSP Virus Kit



Versão 2



O EZ1 DSP Virus Kit em conjunto com o BioRobot<sup>®</sup> EZ1 DSP ou o EZ1 Advanced da QIAGEN<sup>®</sup> é um sistema que utiliza a tecnologia de esferas magnéticas para o isolamento e a purificação de ácidos nucleicos virais de amostras de plasma, soro ou líquido cefalorraquidiano (LCR) humano para utilização em procedimentos de diagnóstico.

Para utilização em diagnóstico in vitro



62724



1050257PT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R1

MAT

1050257PT



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

A QIAGEN é o principal fornecedor de tecnologias inovadoras de amostragem e ensaio, permitindo o isolamento e a detecção do conteúdo de qualquer amostra biológica. Os avançados produtos e serviços de elevada qualidade da nossa empresa garantem o sucesso desde a amostra ao resultado.

### **A QIAGEN é uma empresa de referência em matéria de:**

- Purificação de ADN, ARN e proteínas
- Ensaio de ácidos nucleicos e proteínas
- Investigação em microARN e ARNi
- Automatização de tecnologias de amostragem e ensaio

A nossa missão permitir-lhe-á alcançar o sucesso, bem como resultados notáveis. Para obter mais informações, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Índice

<b>Conteúdo do kit</b>	<b>4</b>
<b>Símbolos</b>	<b>4</b>
<b>Armazenamento</b>	<b>5</b>
<b>Utilização prevista</b>	<b>5</b>
<b>Limitações de utilização do produto</b>	<b>6</b>
<b>Garantia do produto e garantia de satisfação</b>	<b>6</b>
<b>Assistência Técnica</b>	<b>7</b>
<b>Informações sobre segurança</b>	<b>7</b>
<b>Controlo de qualidade</b>	<b>9</b>
<b>Introdução</b>	<b>10</b>
Princípio e procedimento	10
Características de desempenho	13
<b>Equipamento e reagentes a serem fornecidos pelo utilizador</b>	<b>22</b>
<b>Notas importantes</b>	<b>23</b>
Preparar as amostras de soro, plasma e LCR	23
Preparar o ARN transportador (CARRIER)	23
Utilizar um controlo interno (IC)	24
Trabalhar com as estações de trabalho EZ1	25
Armazenar ácidos nucleicos virais	31
<b>Protocolo:</b>	
<b>Purificação de ADN e ARN virais a partir de soro, plasma ou LCR</b>	<b>32</b>
<b>Guia de resolução de problemas</b>	<b>36</b>
<b>Apêndice A: Apresentação de mensagens</b>	<b>40</b>
<b>Apêndice B: Calcular a quantidade de controlo interno (IC)</b>	<b>49</b>
<b>Apêndice C: Folha de amostra para utilizar com o BioRobot EZ1 DSP</b>	<b>52</b>
<b>Apêndice D: Exemplo de um ficheiro de relatório do EZ1 Advanced</b>	<b>53</b>
<b>Referências</b>	<b>54</b>
<b>Informações para encomenda</b>	<b>55</b>

## Conteúdo do kit

<b>EZ1 DSP Virus Kit</b>			<b>(48)</b>
<b>N.º de catálogo</b>			<b>62724</b>
<b>Número de preparações</b>			<b>48</b>
RCV	Cartuchos de reagentes, Vírus*†	<b>REAG</b> <b>CART</b> <b>VIRUS</b>	48
DTH	Porta-pontas descartáveis	<b>DISP</b> <b>TIP</b> <b>HOLD</b>	50
DFT	Pontas com filtro descartáveis	<b>DISP</b> <b>FILT</b> <b>TIP</b>	50
ST	Tubos de amostras (2 ml)	<b>SAMP</b> <b>TUBE</b>	100
ET	Tubos de eluição (1,5 ml)	<b>ELU</b> <b>TUBE</b>	100
CARRIER	ARN transportador	<b>CAR</b> <b>RNA</b>	310 µg
AVE	Tampão de eluição†	<b>ELU</b> <b>BUF</b>	3 x 2 ml
	Cartão Q‡		1
	Manual	<b>H</b> <b>B</b>	1

\* Contém um sal de guanidina. Não compatível com desinfetantes contendo lixívia. Consulte a página 7 para obter informações de segurança.

† Contém azida de sódio como conservante.

‡ As informações codificadas no código de barras do Cartão Q são necessárias para a detecção de dados dos reagentes através da utilização da estação de trabalho EZ 1 Advanced.

## Símbolos



O kit contém reagentes para 48 preparações de amostras

Prazo de validade

Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

Número de catálogo

Número de lote

Número do material

Componentes

Número

	Volume
	Limitação de temperatura
	Fabricante legal
	Nota importante
	Utilizar apenas com
	Contém
	Isotiocianato de guanidina
	Cloridrato de guanidina
	Etanol
	Isopropanol
	Proteinase K
	Este lado para baixo ao abrir

## Armazenamento

Armazene os cartuchos de reagentes (RCV) na vertical à temperatura ambiente (15–25 °C). As partículas magnéticas nos cartuchos de reagentes (RCV) mantêm-se activas quando armazenadas a esta temperatura. **Não congele os cartuchos de reagentes (RCV)**. Quando devidamente armazenados, os cartuchos de reagentes (RCV) mantêm-se estáveis até ao prazo de validade indicado no Cartão Q e na caixa do kit.

O ARN transportador liofilizado (CARRIER) mantém-se estável até ao prazo de validade indicado na caixa do kit quando armazenado à temperatura ambiente.

## Utilização prevista

O EZ1 DSP Virus Kit em conjunto com o BioRobot EZ1 DSP ou o EZ1 Advanced da QIAGEN é um sistema que utiliza a tecnologia de esferas magnéticas para o isolamento e a purificação de ácidos nucleicos virais de amostras de plasma, soro ou LCR humano para utilização em procedimentos de diagnóstico.

Podem ser utilizadas amostras de sangue tratadas com EDTA ou citrato como anticoagulante para a preparação do plasma. As amostras podem ser recém-colhidas ou congeladas, desde que não tenham sido novamente congeladas depois da descongelação.

O produto destina-se a utilizadores profissionais, tais como técnicos e médicos com formação em técnicas de biologia molecular. Quaisquer resultados de

diagnóstico, gerados através do procedimento de preparação de amostras em conjunto com quaisquer ensaios de diagnóstico para aplicação a jusante, têm de ser interpretados tendo em consideração outros resultados clínicos ou laboratoriais.

## **Limitações de utilização do produto**

O sistema não se destina ao isolamento e purificação de ARN e ADN de amostras de sangue total humano, tecido, medula óssea, bactérias ou células obtidas a partir de culturas.

Não foi estabelecido o desempenho em termos de isolamento de ácidos nucleicos de origem bacteriana, fúngica, viral e parasitária de materiais de amostra como, por exemplo, amostras respiratórias, urina e suspensões fecais.

O isolamento e a purificação de ADN fetal de plasma materno não foram avaliados.

As características de desempenho do EZ1 DSP Virus Kit foram estabelecidas para o VIH-1, VHC, VHB, CMV e parvovírus B19, tal como documentado nas figuras deste manual.

É da responsabilidade do utilizador validar as características de desempenho apropriadas do EZ1 DSP Virus para aplicações a jusante baseadas no vírus de ADN e ARN. Para minimizar o risco de um impacto negativo nos resultados do diagnóstico, o produto deve ser utilizado com um controlo interno (IC) durante o processo de preparação, amplificação e detecção de amostras (de acordo com o ensaio para aplicação a jusante utilizado), bem como com controlos positivos e negativos, para que as irregularidades sejam controladas na medida do possível. Para uma validação mais aprofundada, são recomendadas as directrizes da International Conference on Harmonization of Technical Requirements (ICH) descritas em *ICH Q2A: 'Validation of analytical methods: Definitions and terminology* e *ICH Q2B: Validation of analytical methods: Methodology*'.

O manuseamento dos produtos deve ser realizado com todo o cuidado e atenção. Recomendamos a todos os utilizadores dos produtos QIAGEN que respeitem as directrizes NIH elaboradas no âmbito das experiências com ADN recombinante ou outras directrizes aplicáveis.

## **Garantia do produto e garantia de satisfação**

A QIAGEN garante o desempenho de todos os produtos tal como descrito na literatura dos respectivos produtos. O comprador tem de determinar a adequabilidade do produto para a utilização específica em questão. Se, por qualquer motivo excluindo a utilização indevida, o desempenho de qualquer produto não for satisfatório, a QIAGEN irá substituir o mesmo gratuitamente ou procederá ao reembolso do preço de compra. Reservamos o direito de

mudar, alterar ou modificar qualquer produto para melhorar o respectivo desempenho e concepção. Se um produto QIAGEN não satisfizer as suas expectativas, basta contactar o Departamento da Assistência Técnica ou distribuidor local. Poderá optar entre trocar o produto ou que o valor do mesmo seja creditado na sua conta. Existem outras condições que se aplicam a instrumentos científicos, produtos de assistência e produtos expedidos em gelo seco da QIAGEN. Contacte-nos, caso pretenda obter mais informações sobre esta questão.

Pode obter, a pedido, uma cópia dos termos e condições da QIAGEN, sendo igualmente fornecida no verso das nossas facturas. Se tiver dúvidas acerca das especificações ou desempenho de produtos, contacte a Assistência Técnica ou distribuidor local da QIAGEN (consulte o verso do manual ou visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## **Assistência Técnica**

Na QIAGEN, orgulhamo-nos da qualidade e da disponibilidade do nosso suporte técnico. Os nossos departamentos de assistência técnica são compostos por cientistas experientes com conhecimentos práticos e teóricos abrangentes em tecnologias de amostragem e ensaio e utilização dos produtos QIAGEN. Se tiver alguma dúvida ou tiver dificuldades em relação ao EZ1 DSP Virus Kit ou aos produtos QIAGEN de um modo geral, não hesite em contactar-nos.

Os clientes da QIAGEN são a principal fonte de informação no que diz respeito às utilizações avançadas ou especializadas dos nossos produtos. Estas informações são úteis a outros cientistas, bem como aos investigadores da QIAGEN. Por conseguinte, incentivamo-lo a contactar-nos caso tenha alguma sugestão acerca do desempenho dos produtos ou de novas aplicações e técnicas.

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Suporte Técnico em [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) ou contacte um dos Departamentos da Assistência Técnica ou distribuidores locais da QIAGEN (consulte o verso do manual ou visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## **Informações sobre segurança**

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre um avental de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consulte as folhas de dados de segurança do material (MSDSs) adequadas. Estas estão disponíveis online no formato PDF, prático e compacto, no endereço [www.qiagen.com/support/MSDS.aspx](http://www.qiagen.com/support/MSDS.aspx) onde poderá encontrar, visualizar e imprimir as MSDSs para cada kit da QIAGEN e respectivos componentes.



**PRECAUÇÃO: NÃO adicione lixívia nem soluções ácidas directamente aos resíduos provenientes da preparação de amostras.**

Alguns tampões nos cartuchos de reagentes (RCV) contêm cloridrato de guanidina ou isotiocianato de guanidina, que podem formar compostos altamente reactivos quando combinados com lixívia.

Se for derramado líquido destes tampões, limpe com detergente laboratorial adequado e água. Se nas estações de trabalho EZ1 Advanced ou BioRobot EZ1 DSP for derramado líquido que contenha agentes potencialmente infecciosos, desinfecte a estação de trabalho, utilizando os reagentes descritos no manual do utilizador fornecido com a estação de trabalho EZ1 em questão.

Os cartuchos de reagentes (RCV) danificados ou com fugas têm de ser manuseados e eliminados de acordo com os regulamentos de segurança locais. Não utilize cartuchos de reagentes (RCV) ou outros componentes do kit danificados, uma vez que a sua utilização poderá resultar num fraco desempenho do kit.

A QIAGEN não testou os resíduos líquidos gerados pelo procedimento do EZ1 DSP Virus quanto a materiais infecciosos residuais. A contaminação dos resíduos líquidos com materiais infecciosos residuais é altamente improvável, mas não pode ser completamente excluída. Por conseguinte, os resíduos líquidos têm de ser considerados infecciosos e têm de ser manuseados e eliminados de acordo com os regulamentos de segurança locais.

As frases de risco e segurança seguintes aplicam-se aos componentes do EZ1 DSP Virus Kit:

### **Cartucho de reagentes, Vírus (RCV)**



F, Xn

Contém etanol, isotiocianato de guanidina, cloridrato de guanidina, isopropanol e proteinase K: altamente inflamável, nocivo, irritante e sensibilizador. Frases de risco e segurança: \* R11-20/21/22-32-36/38-42/43, S13-26-36/37/39-46

\* R11: Altamente inflamável; R20/21/22: Nocivo por inalação, em contacto com a pele e por ingestão; R32: O contacto com ácidos liberta um gás muito tóxico; R36/38: Irritante para os olhos e pele; R42/43: Poderá provocar sensibilização por inalação e através do contacto com a pele; S13: Mantenha afastada de alimentos, bebidas e alimentos para animais; S26: Em caso de contacto com os olhos, lave imediatamente com água em abundância e procure assistência médica; S36/37/39: Use vestuário protector adequado, luvas e protecção ocular/facial; S46: Se for ingerido, consulte imediatamente um médico e mostre este recipiente ou rótulo.

## **Informações de emergência 24 horas**

Poderão ser obtidas informações de emergência médica em inglês, francês e alemão 24 horas por dia junto do:

Centro de Informações sobre Venenos de Mainz, Alemanha

Tel.: +49-6131-19240

## **Controlo de qualidade**

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade Total certificado por norma ISO da QIAGEN, todos os lotes do EZ1 DSP Virus Kit são testados face a especificações predeterminadas para garantir uma qualidade constante do produto.

## **Introdução**

O EZ1 DSP Virus Kit fornece um procedimento, totalmente automatizado, para a purificação simultânea de ADN e ARN virais do soro, plasma e LCR através da utilização de uma estação de trabalho EZ1 Advanced ou BioRobot EZ1 DSP. O kit pode ser utilizado para purificar ácidos nucleicos de uma gama abrangente de vírus de ADN e ARN. Contudo, o desempenho do kit não está garantido para todas as espécies de vírus e tem de ser validado pelo utilizador. A tecnologia de partículas magnéticas permite a purificação de ácidos nucleicos de elevada qualidade que estejam isentos de proteínas, nucleases e outras impurezas. Os ácidos nucleicos purificados estão prontos a utilizar para a detecção altamente sensível em ensaios a jusante, tais como amplificação ou outras reacções enzimáticas. As estações de trabalho EZ1 Advanced ou BioRobot EZ1 DSP realizam todos os passos do procedimento de purificação. São processadas, no máximo, 6 amostras numa única execução.

## **Princípio e procedimento**

A tecnologia de partículas magnéticas combina a velocidade e a eficiência da purificação de ácidos nucleicos baseada em sílica com o prático manuseamento das partículas magnéticas. O procedimento de purificação foi concebido para garantir um manuseamento seguro e reprodutível de amostras potencialmente infecciosas. O procedimento de purificação é constituído por 4 passos: lise, ligação, lavagem e eluição (consulte abaixo o fluxograma, página 12).

### **Lise com proteinase K**

A proteólise de amostras de soro, plasma ou LCR é realizada em condições altamente desnaturantes a temperaturas elevadas. A lise é realizada na presença do tampão de lise e proteinase K que, em conjunto, garantem a digestão de proteínas com revestimento viral e a inactivação de RNases.

### **Ligação a partículas magnéticas**

O tampão de ligação é adicionado às amostras lisadas para ajustar as condições de ligação. Os lisados misturam-se completamente com as partículas magnéticas para permitir a adsorção ideal de ADN e ARN virais à superfície de sílica. As condições de pH e o sal garantem que a proteína e os outros contaminantes, que podem inibir a PCR e outras reacções enzimáticas a jusante, não se ligam às partículas magnéticas.

### **Lavagem de ácidos nucleicos ligados**

Enquanto o ADN e o ARN virais permanecerem ligados às partículas magnéticas, os contaminantes são eficazmente lavados durante uma sequência de passos de lavagem, utilizando primeiro o tampão de lavagem 1, em seguida o tampão de lavagem 2 e depois o etanol.

## **Eluição de ácidos nucleicos puros**

Num único passo, o ADN e o ARN virais altamente puros são eluídos no tampão de eluição (AVE). Os ácidos nucleicos purificados podem ser utilizados imediatamente em aplicações a jusante ou então armazenados para utilização futura.

## Procedimento do EZ1 DSP

Soro, plasma ou LCR



Lise com proteinase K e tampão de lise

Partículas magnéticas e tampão de ligação adicionados a lisados

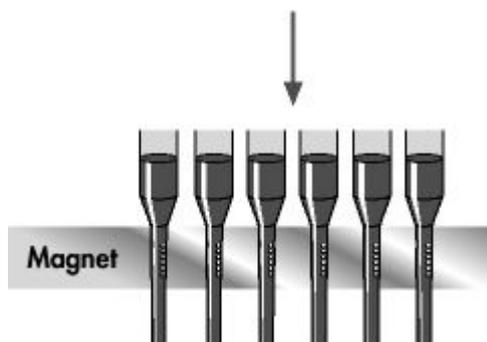


Ácidos nucleicos ligados a partículas magnéticas



Separação magnética

Lavar com tampão de lavagem 1, em seguida com tampão de lavagem 2 e depois com etanol



Separação magnética



Eluir com tampão de eluição (AVE)



Ácidos nucleicos virais puros, de elevada qualidade

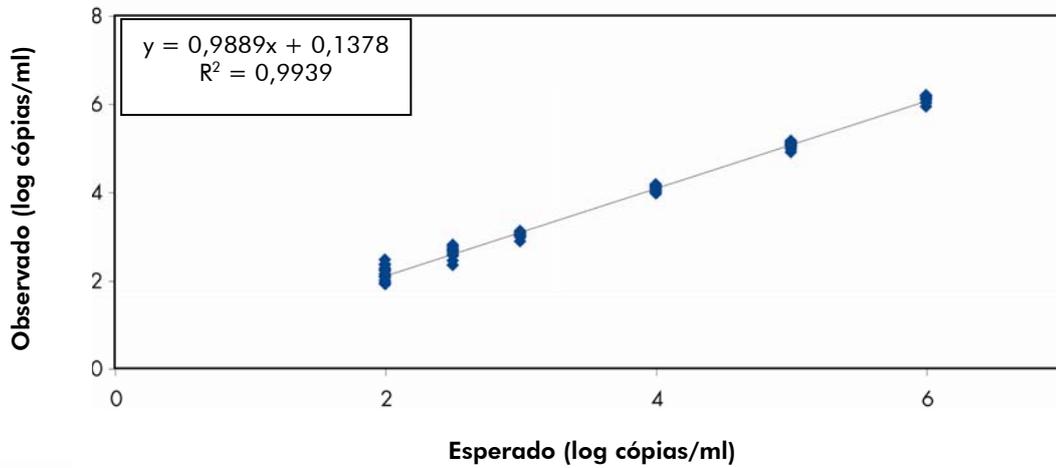
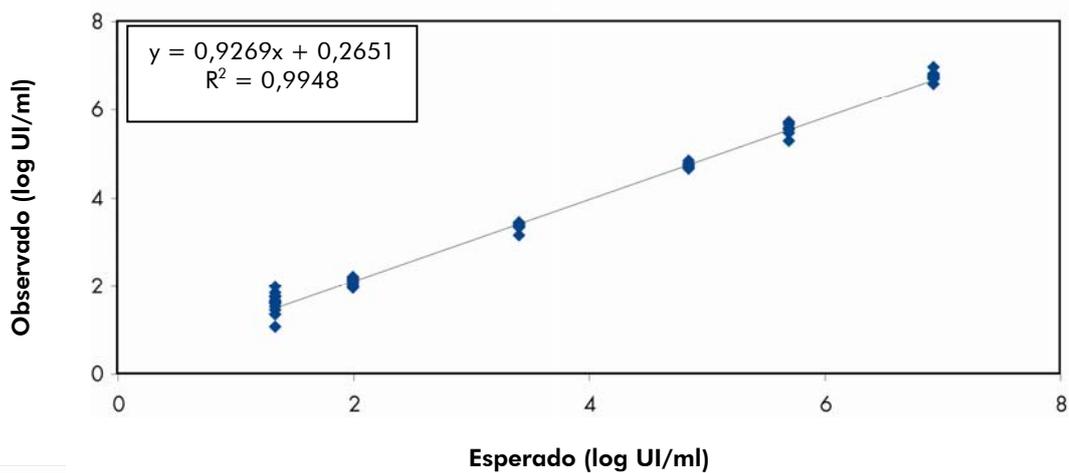
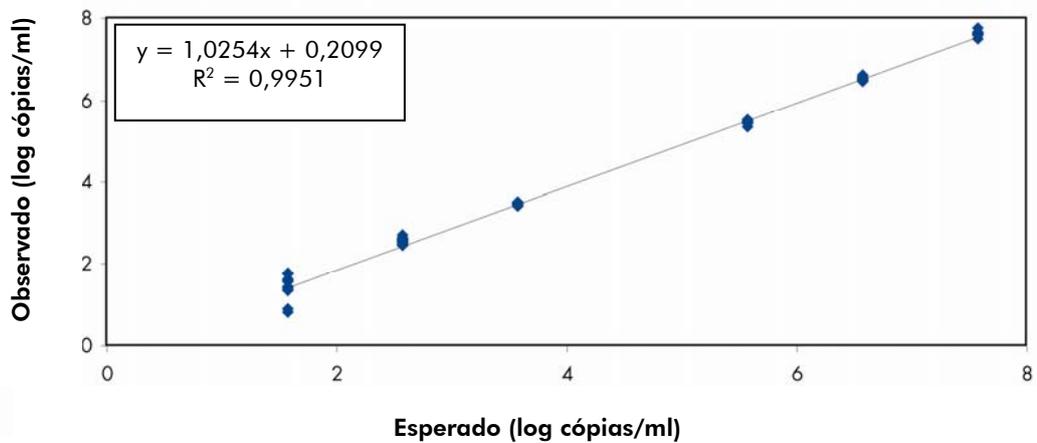
## Características de desempenho

### Intervalo linear

O intervalo linear do EZ1 DSP Virus Kit foi avaliado para os vírus de ARN-VHC e VIH-1 e o vírus de ADN-VHB. Os testes foram efectuados com diluições de painéis de vírus quantificados realizados em plasma ou soro humanos negativos ao VHB, VHC e VIH-1. Foram testadas séries de diluição com seis titulações de vírus diferentes com 12 replicados cada. O intervalo linear do procedimento do EZ1 DSP Virus Kit foi determinado para o VHB, VHC e VIH-1 com os ensaios de carga viral Abbott RealTime (Tabela 1, Figura 1). Foram adicionados controlos internos RealTime (17  $\mu$ l cada) directamente a cada amostra de VIH-1 ou VHC antes da extracção. Para o RealTime HBV, o controlo interno 3,4  $\mu$ l RealTime HBV foi combinado com ARN transportador para cada amostra. Os ácidos nucleicos virais foram extraídos a partir de amostras de 400  $\mu$ l e eluídos em tampão de eluição (AVE) de 90  $\mu$ l. A PCR foi realizada no Abbott *m2000rt*.

**Tabela 1. Origem das amostras e ensaios a jusante utilizados para a determinação do intervalo linear de rendimentos com o protocolo EZ1 DSP Virus**

<b>Vírus</b>	<b>Origem</b>	<b>Ensaio a jusante</b>	<b>Ensaio manual utilizado</b>
VIH-1	BBI (Boston Biomedica, Inc., Boston, EUA) VIH anómalo, plasma recalcificado BBI	Abbott RealTime HIV-1 (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HIV-1
VHC	ProMedDx (ProMedDx LLC Norton, MA, EUA), amostra de doente, soro humano normal agrupado (pool)	Abbott RealTime HCV (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HCV
VHB	Teragenix (Teragenix Coporate, Ft. Lauderdale, FL, EUA), amostra de doente, plasma humano recalcificado	Abbott RealTime HBV (Abbott Molecular Inc.)	Abbott RealTime HBV

**A****B****C**

**Figura 1. Intervalo linear de rendimentos utilizando o protocolo EZ1 DSP Virus.** ○ intervalo linear do EZ1 DSP Virus foi determinado utilizando séries de diluição viral e os ensaios Abbott RealTime (Tabela 1) **A** para VIH-1, **B** para VHC e **C** para VHB.

## Precisão

Os desvios padrão e coeficientes de variação (CVs) foram determinados para séries de diluição de VIH-1, VHC e VHB no intervalo linear dos ensaios a jusante adequados. Para a análise de precisão, foram utilizados os mesmos ensaios a jusante para a determinação do intervalo linear (Tabela 1, página 13). Os dados de precisão inter-ensaios são apresentados nas Tabelas 2–4. Para cada membro do painel, foram extraídos 12 replicados em 12 execuções separadas no BioRobot EZ1 DSP. A PCR foi realizada em 2 execuções de 6 replicados cada no Abbott *m2000rt*.

**Tabela 2. Precisão inter-ensaios do protocolo EZ1 DSP Virus utilizando o ensaio Abbott RealTime HIV-1**

Membro do painel	n	Cópias/ml	CV (%)	log cópias/ml	DP (log cópias/ml)
1	12	148	40	2,17	0,17
2	12	426	26	2,63	0,13
3	12	1082	14	3,03	0,06
4	11	11.506	14	4,06	0,06
5	12	116.145	15	5,07	0,07
6	12	1.300.669	16	6,11	0,08

**Tabela 3. Precisão inter-ensaios do protocolo Z1 DSP Virus utilizando o ensaio Abbott RealTime HCV**

Membro do painel	n	UI/ml	CV (%)	log UI/ml	DP (log UI/ml)
1	12	39	56	1,59	0,27
2	12	122	22	2,09	0,10
3	12	2331	16	3,37	0,08
4	11	51.582	12	4,71	0,05
5	12	357.547	23	5,55	0,11
6	12	5.505.964	24	6,74	0,10

**Tabela 4. Precisão inter-ensaios do protocolo EZ1 DSP Virus utilizando o ensaio Abbott RealTime HBV**

Membro do painel	n	Cópias/ml	CV (%)	log cópias/ml	DP (log cópias/ml)
1	12	22	60	1,34	0,34
2	12	357	16	2,55	0,07
3	12	2835	7	3,45	0,03
4	11	280.221	10	5,45	0,05
5	12	3.311.311	12	6,52	0,05
6	12	40.040.547	14	7,60	0,06

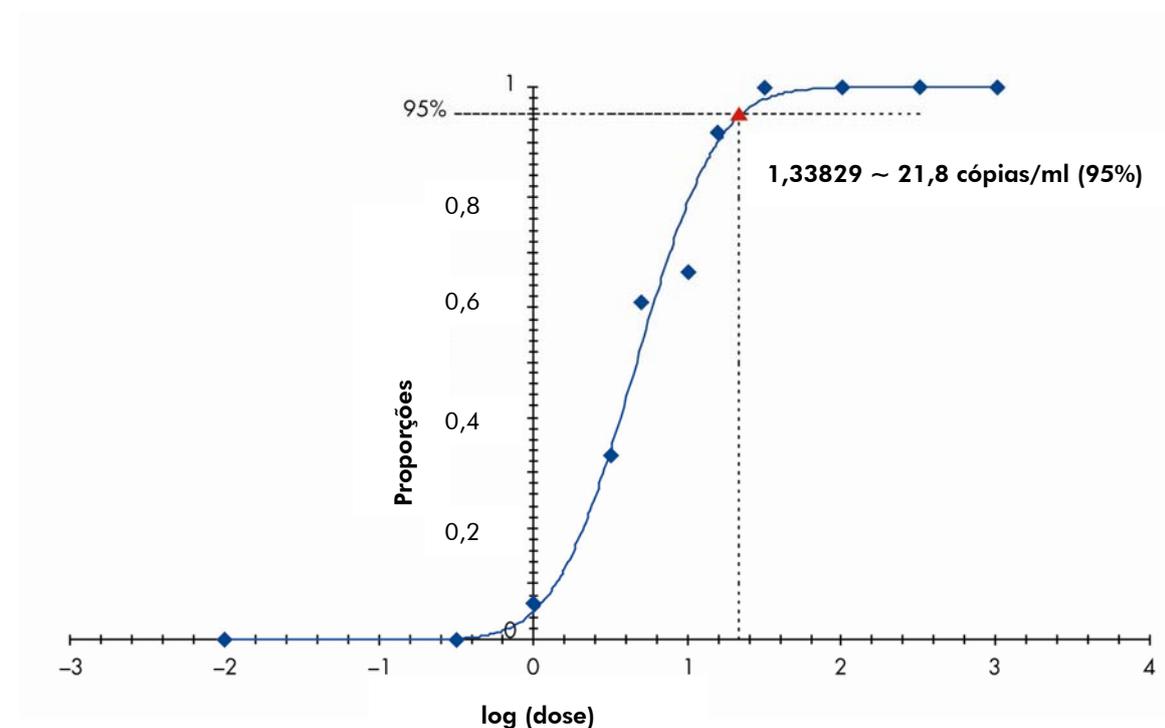
### Limite de detecção

O limite de detecção foi determinado pelo valor Probit de 95% para o sistema EZ1 DSP Virus utilizando a norma internacional 97/656 da OMS relativa ao vírus VIH-1, a norma internacional 97/746 da OMS relativa ao vírus VHB e o sobrenadante de cultura de células de CMV quantificado. O limite de detecção foi determinado através do processamento de séries de diluição dos vírus adequados. Os vírus foram diluídos num pool de plasma humano normal com EDTA negativo ao VIH, VHB e CMV. Cada passo da diluição foi preparado em, pelo menos, 3 execuções independentes, com no mínimo 6 replicados por diluição. Foram utilizados 400 µl de plasma para a preparação de amostras no BioRobot EZ1 DSP com eluição em 60 µl.

Foram utilizados *artus*<sup>®</sup> HBV PCR Kits para a detecção de ADN-VHB e os *artus* CMV PCR Kits para a detecção de ADN-CMV. As amostras foram analisadas num Instrumento LightCycler<sup>®</sup> 1.2 (Roche), num Rotor-Gene<sup>™</sup> 3000 (Corbett-Research) e num ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 SDS (Applied Biosystems). Foi utilizado o Teste COBAS<sup>®</sup> AmpliCor<sup>®</sup> HIV-1Monitor<sup>®</sup> (versão 1.5) para a detecção do ARN-VIH utilizando o COBAS AmpliCor Analyzer. Os dados combinados para todas as amostras foram avaliados utilizando análise Probit. Os dados são apresentados nas Tabelas 5–6, com gráficos Probit representativos nas Figuras 2–3.

**Tabela 5. Limite de detecção do ADN do VHB e CMV utilizando o sistema EZ1 DSP Virus e os artus PCR Kits**

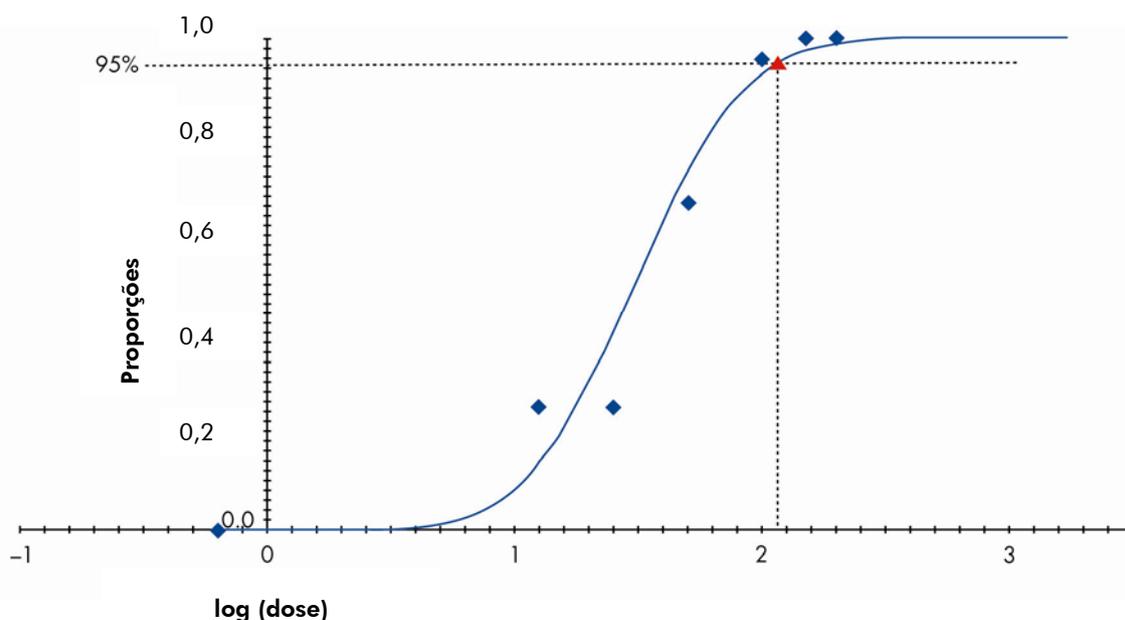
Vírus	Titulação inicial	Resultados (LightCycler)	Resultados (Rotor-Gene)	Resultados (ABI PRISM)
VHB	Valor Probit de 95% (UI/ml)	45,7	14,4	13,2
	Intervalo de confiança (UI/ml)	28–102	9,5–26,5	9,0–23,1
CMV	Valor Probit de 95% (cópias/ml)	67,2	21,8	38,3
	Intervalo de confiança (cópias/ml)	41,8–142	14,5–44,1	21,5–89,8



**Figura 2. Análise Probit para detecção de ADN-CMV utilizando o sistema EZ1 DSP Virus e o artus CMV RG PCR Kit.** Os ácidos nucleicos virais foram purificados utilizando o sistema EZ1 DSP Virus e o artus CMV PCR RG Kit foi utilizado para a detecção de ADN-CMV no Rotor-Gene 3000. O valor Probit de 95% foi de 21,8 cópias/ml.

**Tabela 6. Limite de detecção do ARN-HIV utilizando o sistema EZ1 DSP Virus e o COBAS Amplicor HIV-1 Monitor Test, versão 1.5**

Titulação inicial (UI/ml)	Resultados
Valor Probit de 95% (UI/ml)	114,5
Intervalo de confiança (UI/ml)	82,9–194,3



**Figura 3. Análise Probit para detecção do ARN-HIV utilizando o sistema EZ1 DSP Virus e o COBAS Amplicor HIV-1 Monitor Test, Versão 1.5.** Os ácidos nucleicos virais foram purificados utilizando o sistema EZ1 DSP Virus, com um volume de entrada da amostra de 400  $\mu$ l e uma eluição de 60  $\mu$ l. Foi utilizado o COBAS Amplicor HIV-1 Monitor Test para a detecção do ARN-HIV no COBAS Amplicor Analyzer no modo ultra-sensível. O valor Probit de 95% foi de 114,5 UI/ml.

### Exclusão de "carry-over" de amostras

Foram realizadas nove execuções na estação de trabalho BioRobot EZ1 DSP para avaliar o risco de eventos de contaminação cruzada durante e entre procedimentos do EZ1 DSP Virus. O teste foi realizado utilizando uma amostra do doente de parvovírus B19 quantificado. A carga viral das amostras positivas utilizada para os testes de "carry-over" foi de  $1,0 \times 10^8$  UI/ml. Para a diluição de amostras positivas e, como amostras de controlo negativo, foi utilizado um pool de plasma humano com EDTA negativo ao parvovírus B19.

Para detectar o "carry-over" de amostra-para-amostra, foram realizadas 2 execuções com uma disposição alternada em tabuleiro (método "checkerboard") de amostras negativas e altamente positivas. As terceiras execuções foram realizadas utilizando todas as amostras negativas para monitorizar a possibilidade de ocorrência de "carry-over" de execução-para-execução. Esta

disposição de amostras foi repetida três vezes, resultando num total de nove execuções. O ADN do parvovírus B19 foi detectado e quantificado utilizando o *artus* Parvo B19 RG PCR Kit com a marca CE-IVD no Rotor-Gene 3000. O limite de detecção analítica do *artus* Parvo B19 RG PCR Kit é determinado como sendo de 0,2 UI/ $\mu$ l no eluato ( $p = 0,05$ ). Tal indica que existe 95% de probabilidade de vir a ser detectado um volume de 0,2 UI/ $\mu$ l no eluato.

Todas as amostras altamente positivas foram detectadas como sendo positivas utilizando o *artus* Parvo B19 RG PCR Kit. Todas as amostras negativas, nas execuções "checkerboard" e nas execuções totalmente negativas, não foram reactivas (Tabela 7). Estas experiências demonstram que o protocolo EZ1 DSP Virus não proporciona o "carry-over" de amostras nestas condições.

**Tabela 7. Configuração do teste de contaminação cruzada e valores  $C_T$  para a detecção do ADN do parvovírus B19**

Execução	Posição					
	1	2	3	4	5	6
1	15,47	X	15,41	X	15,36	X
2	X	15,48	X	15,53	X	15,32
3	X	X	X	X	X	X
4	15,35	X	15,2	X	15,27	X
5	X	15,21	X	15,13	X	15,43
6	X	X	X	X	X	X
7	15,62	X	15,48	X	15,23	X
8	X	15,31	X	15,83	X	15,62
9	X	X	X	X	X	X

Valor  $C_T$  médio de todas as amostras =  $15,40 \pm 0,18$  (CV = 1,14%)

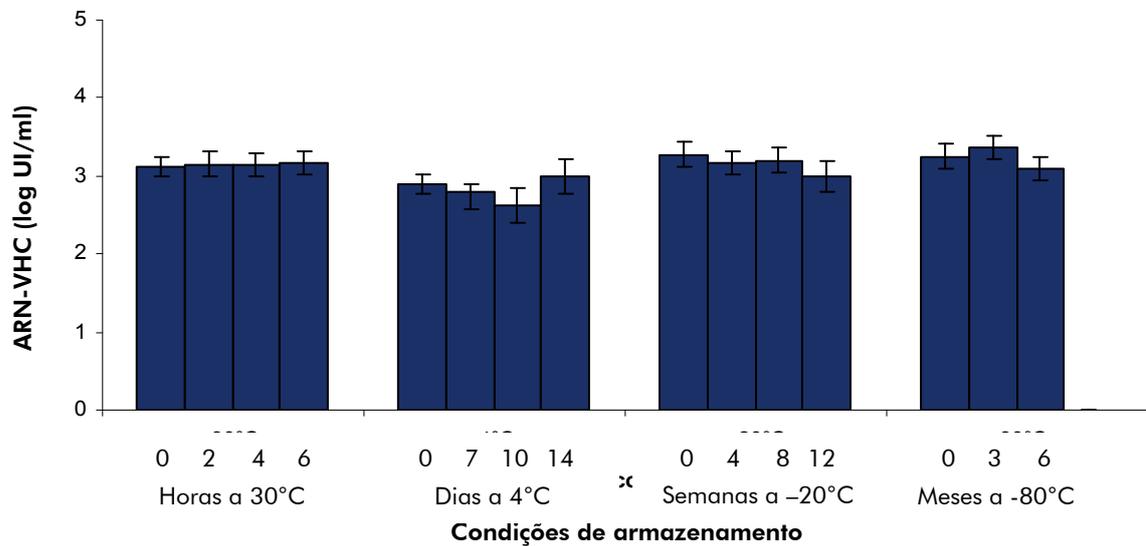
X: Não reactivo após 45 ciclos de PCR.

### Estabilidade

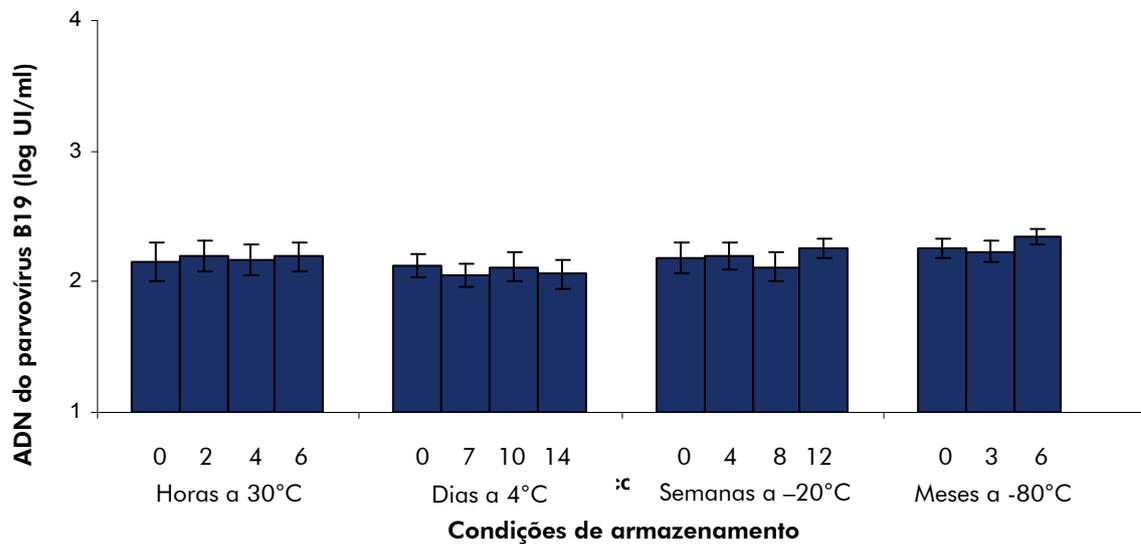
Foi determinada a estabilidade do ARN e do ADN virais em eluatos gerados utilizando o EZ1 DSP Virus Kit. O plasma humano com EDTA foi enriquecido com  $1 \times 10^3$  UI/ml de AcroMetrix OptiQuant<sup>®</sup> HCV RNA para VHC e material padrão VQC para o parvovírus B19. Foram processados 18 replicados, de acordo com o período de tempo de teste e condição de incubação, utilizando o sistema EZ1 DSP Virus. Os eluatos que continham ADN do parvovírus B19 e ARN-VHC foram incubados durante, no máximo, 6 horas a 30 °C, 14 dias a 4 °C, 12 semanas a -20 °C e 9 meses a -80 °C. O estudo ainda está em curso. Os eluatos foram analisados utilizando um ensaio validado internamente de

RT-PCR para VHC e o *artus* Parvo B19 RG PCR. Verificou-se uma falha no ensaio de RT-PCR em 18 replicados para o ARN-VHC após o armazenamento a 4 °C durante 14 dias (Figura 4).

**A**



**B**



**Figura 4. Estabilidade dos ácidos nucleicos virais.** Foi determinada a estabilidade do ARN e do ADN virais em eluatos gerados utilizando o EZ1 DSP Virus Kit para o **A** ARN-VHC e o **B** ADN do parvovirus B19.

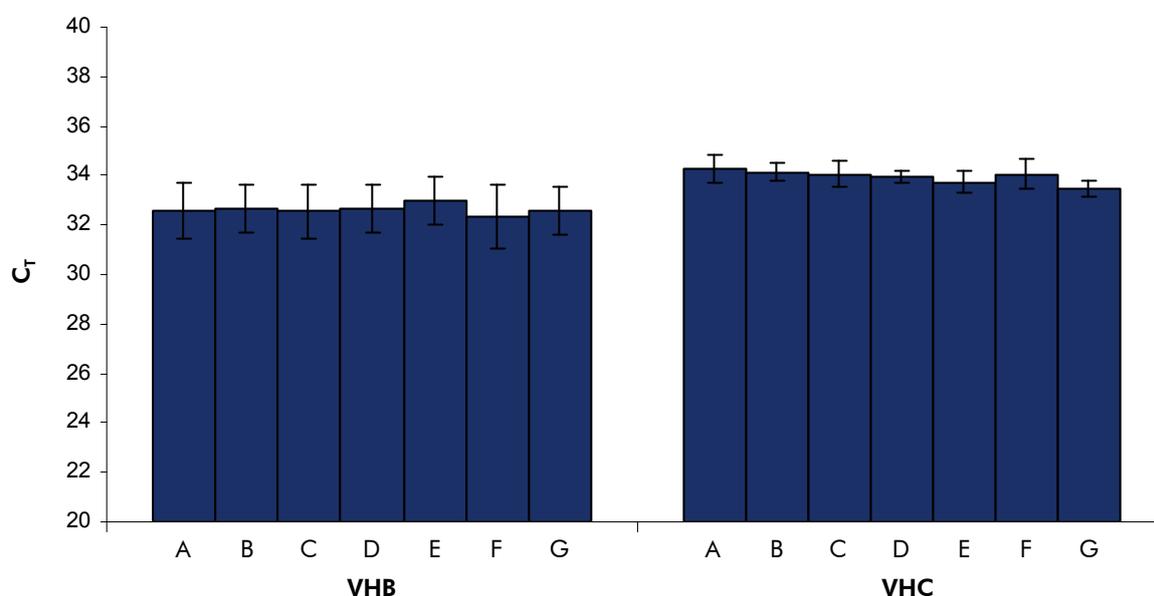
## Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi determinada utilizando 3 estações de trabalho BioRobot EZ1 DSP em 3 dias diferentes (consulte a Tabela 8, página seguinte). Para cada teste (A–G), foram processados 12 replicados em 2 execuções no BioRobot EZ1 DSP. O plasma humano com EDTA foi enriquecido com  $1 \times 10^4$  UI/ml de AcroMetrix OptiQuant HCV RNA e  $1 \times 10^3$  UI/ml de AcroMetrix OptiQuant HBV DNA. O ADN-VHB foi determinado utilizando o *artus* HBV RG PCR Kit e o ARN-VHC utilizando um ensaio validado internamente de RT-PCR para VHC.

O procedimento automatizado é altamente reprodutível, como demonstrado pelos resultados comparáveis da purificação de ácidos nucleicos virais em 3 estações de trabalho BioRobot EZ1 DSP em 3 dias diferentes (Figura 5).

**Tabela 8. Configuração do teste de reprodutibilidade**

Configuração do teste	1.º dia	2.º dia	3.º dia
BioRobot EZ1 DSP I	Teste A	Teste D	Teste F
BioRobot EZ1 DSP II	Teste B	Teste E	
BioRobot EZ1 DSP III	Teste C		Teste G



**Figura 5. Reprodutibilidade.** A reprodutibilidade foi determinada em três estações de trabalho BioRobot EZ1 DSP em três dias diferentes.

## Equipamento e reagentes a serem fornecidos pelo utilizador

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre um avental de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consulte as Folhas de dados de segurança do material (MSDSs) adequadas, disponíveis junto do fornecedor do produto.

### Todos os protocolos

- Pipetas\* e pontas de pipeta estéreis isentas de RNase
- Lenço de papel suave
- Água
- Etanol a 70%
- Opcional: Vórtex\* (se for necessário misturar amostras de soro ou plasma congeladas)

### Para utilizadores do EZ1 Advanced

- Estação de trabalho EZ1 Advanced\* (n.º cat. 9001411)
- Cartão EZ1 Advanced DSP Virus (n.º cat. 9018306)
- Para o controlo das amostras, é necessário utilizar um dos seguintes componentes:
  - PC\* (incluindo monitor) com o software EZ1 Advanced Communicator (n.º cat. 9017759)
  - Software EZ1 Advanced Communicator (n.º cat. 9018529), se utilizar PC próprio\*
  - Impressora\* (n.º cat. 9018464) e pacote de acessórios para impressora (n.º cat. 9018465)

### Para utilizadores do BioRobot EZ1

- Estação de trabalho BioRobot EZ1 DSP\* (n.º cat. 9001360)
- Cartão EZ1 DSP Virus (n.º cat. 9017707)

\* Assegure-se de que os instrumentos foram verificados, mantidos e calibrados regularmente de acordo com as recomendações do fabricante.

## Notas importantes

### Preparar as amostras de soro, plasma e LCR

O procedimento de purificação é otimizado para utilização com amostras de soro, plasma ou LCR de 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l ou 400  $\mu$ l. Podem ser utilizadas amostras de sangue tratadas com EDTA ou citrato como anticoagulante para a preparação do plasma. As amostras podem ser recém-colhidas ou congeladas, desde que não tenham sido novamente congeladas depois da descongelação.

Após a colheita e a centrifugação, o plasma, o soro ou o LCR podem ser armazenados a 2–8 °C durante, no máximo, 6 horas. Para um armazenamento mais prolongado, recomendamos o congelamento de alíquotas a –20 °C ou –80 °C. Descongele as amostras à temperatura ambiente (15–25 °C) e processe as amostras imediatamente quando tiverem estabilizado à temperatura ambiente. Não volte a congelar as alíquotas depois da sua descongelação. A congelação/descongelação conduz à desnaturação e precipitação de proteínas, resultando em titulações virais reduzidas e, por conseguinte, rendimentos reduzidos de ácidos nucleicos virais. Se forem visíveis crioprecipitados nas amostras, centrifugue a 6800 x g durante 3 minutos, transfira os sobrenadantes para tubos novos sem interferir com os pellets e inicie, imediatamente, o procedimento de purificação.

### Preparar o ARN transportador (CARRIER)

Durante o procedimento de purificação, o ARN transportador (CARRIER) serve dois propósitos. Em primeiro lugar, melhora a ligação de ácidos nucleicos virais à superfície de sílica das partículas magnéticas, especialmente se a amostra contiver um número reduzido de moléculas-alvo. Em segundo lugar, a adição de grandes quantidades de ARN transportador (CARRIER) reduz as probabilidades numa rara eventualidade das RNases não serem desnaturadas pelos sais caotrópicos e o detergente no tampão de lise. Se o ARN transportador (CARRIER) não for adicionado à reacção, a recuperação de ADN ou ARN viral pode ser reduzida.

O ARN transportador liofilizado (CARRIER) fornecido com o kit é suficiente para 48 preparações de amostras. A concentração de ARN transportador (CARRIER) utilizado no procedimento de purificação permite ao EZ1 DSP Virus Kit ser utilizado como um sistema de purificação geral que é compatível com muitos sistemas de amplificação diferentes e que é apropriado para a purificação de ácidos nucleicos de uma vasta gama de vírus de ADN e ARN. Contudo, os sistemas de amplificação variam em termos de eficiência, dependendo da quantidade total de ácidos nucleicos presentes na reacção. Os eluatos obtidos através da utilização do EZ1 DSP Virus Kit contêm ácidos nucleicos virais e ARN transportador (CARRIER) e a quantidade de ARN transportador (CARRIER) em cada eluato excede grandemente a quantidade de ácidos nucleicos virais. A

quantidade de eluato a adicionar a reacções de amplificação a jusante deve, por conseguinte, basear-se na quantidade de ARN transportador (CARRIER) no eluato. Para obter os níveis mais elevados de sensibilidade nas reacções de amplificação, poderá ser necessário ajustar a quantidade da solução de ARN transportador (CARRIER) adicionada.

Dissolva o ARN transportador (CARRIER) liofilizado completamente em 310  $\mu$ l de tampão de eluição (AVE), divida-o em alíquotas de tamanho conveniente e armazene a  $-20$  °C. Não congele-descongele as alíquotas mais de que 2 vezes.

Para cada amostra processada, dilua 3,6  $\mu$ l da solução-mãe de ARN transportador (CARRIER) num volume total de 60  $\mu$ l utilizando o tampão de eluição (AVE) (e/ou uma solução de controlo interno). Um volume de 50  $\mu$ l desta solução ARN transportador-tampão de eluição (CARRIER-AVE) é transferido para a mistura de lise, correspondendo a 3  $\mu$ g de ARN transportador (CARRIER).

Se pretender utilizar um controlo interno (IC), consulte "Utilizar um controlo interno (IC)" abaixo.

**i** O procedimento de purificação é optimizado de modo a que seja adicionado 3  $\mu$ g de ARN transportador (CARRIER) por amostra. Caso uma quantidade diferente de ARN transportador (CARRIER) se ter revelado mais adequada para um sistema de amplificação específico, altere o volume da solução-mãe de ARN transportador (CARRIER) misturada com tampão de eluição (AVE) ou utilize uma concentração diferente de solução-mãe. O volume total da solução ARN transportador-tampão de eluição (CARRIER-AVE) deve ser de 60  $\mu$ l, dos quais 50  $\mu$ l são transferidos para a mistura de lise. A utilização de quantidades diferentes de ARN transportador (CARRIER) tem de ser validada para cada tipo de amostra em particular e ensaio a jusante.

## Utilizar um controlo interno (IC)

A utilização do EZ1 DSP Virus Kit em conjunto com sistemas de amplificação à venda no mercado pode requerer a introdução de um controlo interno (IC) no procedimento de purificação para monitorizar a eficiência da preparação da amostra.

O ADN ou o ARN de controlo interno deve ser combinado com a solução-mãe de ARN transportador (CARRIER) (3,6  $\mu$ l) numa mistura. Para cada amostra, a mistura ARN transportador-controlo interno (CARRIER-IC) deve ter um volume de 60  $\mu$ l, dos quais 50  $\mu$ l serão transferidos para a mistura de lise. Esta quantidade corresponde a 3  $\mu$ l da solução-mãe de ARN transportador (CARRIER) mais 47  $\mu$ l de tampão de eluição (AVE) e/ou solução de controlo interno.

**i** Se o controlo interno (IC) se apresentar estável no plasma, soro ou LCR (por exemplo, ARN blindado), pode ser, em alternativa, adicionado à amostra um pouco antes do início da preparação da amostra.

Consulte as instruções do fabricante para determinar a quantidade ideal de controlo interno (IC) para aplicações a jusante específicas. A utilização de uma quantidade diferente da recomendada pode reduzir a eficiência da amplificação. Para determinar a quantidade de controlo interno (IC) necessário para o protocolo EZ1 DSP Virus, é preciso tomar em consideração o volume de eluato. Consulte "Apêndice B: Calcular a quantidade de controlo interno (IC)", página 49, para obter instruções detalhadas sobre como calcular o volume correcto de controlo interno (IC).

Não são fornecidos controlos internos (IC) no EZ1 DSP Virus Kit.

## **Trabalhar com as estações de trabalho EZ1**

As principais características das estações de trabalho EZ1 Advanced e BioRobot EZ1 DSP incluem:

- Purificação de ácidos nucleicos de elevada qualidade de 1 a 6 amostras por execução
- Equipamento de pequena dimensão para poupar espaço no laboratório
- Cartões EZ1 DSP pré-programados com protocolos prontos a utilizar para a purificação de ácidos nucleicos
- Cartuchos de reagentes selados e enchidos previamente para a configuração fácil, rápida e segura das estações de trabalho EZ1
- Automatização completa da purificação de ácidos nucleicos desde a abertura dos cartuchos de reagentes à eluição dos ácidos nucleicos, sem passos de centrifugação manual

As características adicionais do EZ1 Advanced incluem:

- Leitura do código de barras e controlo de amostras
- Detecção de dados do kit com o Cartão Q fornecido no kit
- Lâmpada UV para ajudar a eliminar o "carry-over" de amostras de execução para execução e para permitir a descontaminação das superfícies da mesa de trabalho

**i** A descontaminação por UV ajuda a reduzir a possível contaminação por agentes patogénicos nas superfícies da mesa de trabalho do EZ1 Advanced. A eficiência da inactivação deverá ser determinada para cada organismo específico e depende, por exemplo, da espessura da camada e do tipo de amostra. A QIAGEN não pode garantir a erradicação completa de agentes patogénicos específicos.

## Cartão EZ1 DSP Virus ou cartão EZ1 Advanced DSP Virus

Os protocolos para a purificação de ácidos nucleicos virais encontram-se armazenados no cartão EZ1 Advanced DSP Virus ou no cartão EZ1 DSP Virus pré-programados. Basta o utilizador inserir o cartão EZ1 Advanced DSP no EZ1 Advanced ou o cartão EZ1 DSP no BioRobot EZ1 DSP, e o instrumento está pronto para executar o protocolo (Figuras 6 e 7).



**Figura 6. Facilidade de configuração do protocolo utilizando os cartões EZ1.** Inserção de um cartão EZ1, contendo o protocolo, no EZ1 Advanced.

**i** A estação de trabalho só deve ser ligada depois de inserido um cartão EZ1 DSP. Certifique-se de que o cartão EZ1 DSP se encontra totalmente inserido! Caso contrário, os dados essenciais do instrumento podem perder-se, dando origem a um erro na memória. O cartão EZ1 DSP não deve ser trocado enquanto a estação de trabalho estiver ligada.



**Figura 7. Cartão EZ1 totalmente inserido na respectiva ranhura.**

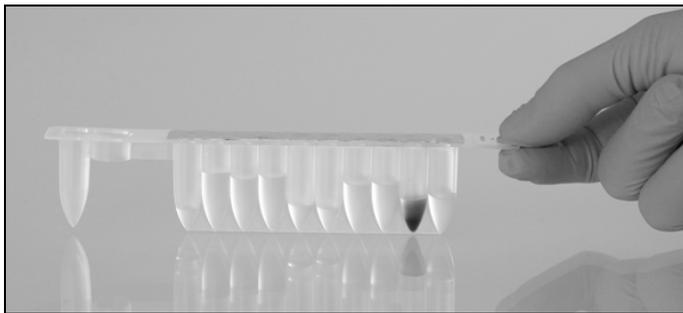
O EZ1 DSP Virus Kit requer a utilização do cartão EZ1 DSP Virus ou do cartão EZ1 Advanced DSP Virus, que contém os protocolos para purificar os ácidos nucleicos virais a partir de soro, plasma e LCR.

## Cartuchos de reagentes (RCV)

Os reagentes para a purificação de ácidos nucleicos de uma única amostra estão contidos num único cartucho de reagentes (RCV) (Figura 8, página seguinte). Cada poço do cartucho (RCV) contém um reagente específico, como por exemplo partículas magnéticas, tampão de lise, tampão de lavagem ou tampão de eluição (AVE) isento de RNase. Dado que cada poço contém apenas a quantidade de reagente necessária, evita-se a geração de resíduos adicionais provenientes dos restos de reagentes no fim do procedimento de purificação.

Os cartuchos de reagentes (RCV) fornecidos com o EZ1 DSP Virus Kit foram previamente enchidos com todos os reagentes necessários para a purificação de ácidos nucleicos virais, à excepção de ARN transportador (CARRIER). O ARN transportador (CARRIER) e os controlos internos (IC) (opcionais) são adicionados num tubo à parte do cartucho de reagentes (RCV).

**A**



**B**



**Figura 8. Facilidade na configuração da estação de trabalho utilizando cartuchos de reagentes (RCV).** **A** Um cartucho de reagentes selado e enchido previamente (RCV). Os níveis de enchimento variam, consoante o tipo de cartucho de reagentes (RCV). **B** Carregamento dos cartuchos de reagentes (RCV) no suporte de cartuchos. O próprio suporte

de cartuchos está identificado com uma seta para indicar a direcção na qual se devem carregar os cartuchos de reagentes (RCV).

### **Mesa de trabalho**

A mesa de trabalho do EZ1 Advanced ou do BioRobot EZ1 DSP é o local onde o utilizador carrega as amostras e os componentes do EZ1 DSP Virus Kit (Figura 9).

Os detalhes sobre a configuração da mesa de trabalho são apresentados no visor de vácuo fluorescente (VFD) do EZ1 Advanced ou no visor de cristais líquidos (LCD) do painel de controlo do BioRobot EZ1 DSP quando o utilizador inicia a configuração da mesa de trabalho.

O visor do instrumento apresenta também o estado do protocolo durante o procedimento de purificação automatizado.



**Figura 9. Mesa de trabalho do EZ1 Advanced ou do BioRobot EZ1 DSP.**

1. Tubos de eluição (ET) (1,5 ml) carregados na primeira fila.
2. Porta-pontas descartáveis (DTH) contendo pontas com filtro descartáveis (DFT) carregados na segunda fila.
3. Tubo (ET) (1,5 ml) contendo ARN transportador (CARRIER) e controlo interno (IC) (se utilizado) em tampão de eluição (AVE), carregado na terceira fila.
4. Tubos de amostras (ST) (2 ml) carregados na quarta fila.
5. Cartuchos de reagentes (RCV) carregados no suporte de cartuchos.
6. Bloco de aquecimento com tubos (ST) de 2 ml nos cartuchos de reagentes para lise.

### **Deteção de dados com o EZ1 Advanced**

O EZ1 Advanced permite a detecção abrangente de uma diversidade de dados para um maior controlo e fiabilidade dos processos. O número de lote e o prazo de validade do EZ1 DSP Kit são introduzidos no início do protocolo utilizando o código de barras do Cartão Q. A ID do utilizador e o código de barras do Cartão Q podem ser introduzidos manualmente utilizando o teclado

ou através da leitura dos códigos de barras utilizando o leitor de código de barras portátil. As informações de amostragem e ensaio também podem ser introduzidas, opcionalmente, no início do protocolo. No fim da execução do protocolo, é automaticamente gerado um ficheiro de relatório. O EZ1 Advanced pode armazenar até 10 ficheiros de relatório e os dados podem ser transferidos para um PC ou directamente impressos numa impressora (para obter informações sobre encomenda, consulte “Equipamento e reagentes a serem fornecidos pelo utilizador”, página 55).

Para receber os ficheiros de relatório num PC, é necessário instalar o software EZ1 Advanced Communicator. O software recebe um ficheiro de relatório e armazena-o numa pasta definida pelo utilizador. Quando o PC recebe o ficheiro de relatório, é possível utilizá-lo e processá-lo com um sistema de gestão de informação laboratorial (LIMS) ou outros programas. Nos ficheiros de relatório, os 6 canais de pipetagem do EZ1 Advanced são designados da esquerda para a direita, Canais A a F.

Durante a leitura da ID do utilizador ou código de barras do Cartão Q com o leitor de código de barras, é emitido um sinal sonoro para confirmar a introdução de dados. Depois de apresentadas durante 2 segundos, as informações são automaticamente armazenadas e é apresentada a mensagem do ecrã seguinte. Durante a leitura da ID da amostra, ID do kit de ensaio ou das notas, é emitido um sinal sonoro para confirmar a introdução de dados, as informações são apresentadas e aparece uma mensagem a solicitar-lhe que introduza o item seguinte da informação. Depois da leitura da ID da amostra, ID do kit de ensaio e das notas, prima “ENT” uma vez para confirmar se as informações introduzidas estão correctas. Se, por exemplo, tiver sido lido um código de barras incorrecto para uma das amostras, prima “ESC” e, em seguida, efectue novamente a leitura de todos os códigos de barras das amostras de acordo com as instruções no ecrã. Para a ID do utilizador e notas, pode introduzir os números utilizando o teclado ou pode criar facilmente os seus próprios códigos de barras para codificar estes números.

## **Fluxo de trabalho do funcionamento do EZ1 DSP Virus**

**Inserir o cartão EZ1 Advanced DSP Virus ou o cartão EZ1 DSP Virus na ranhura do cartão EZ1**



**Ligar o EZ1 Advanced ou o BioRobot EZ1 DSP**



**Seguir as mensagens no ecrã relativas à detecção de dados\***



**Seguir as mensagens no ecrã relativas à configuração da mesa de trabalho**



**Iniciar o protocolo**



**Efectuar a colheita de ácidos nucleicos purificados**



**Descontaminação por UV \***

\* Apenas EZ1 Advanced.

## **Armazenar ácidos nucleicos virais**

Para o armazenamento a curto prazo (até 24 horas), recomendamos que armazene o ADN e o ARN virais purificados a 2–8 °C. Para o armazenamento a longo prazo (superior a 24 horas), recomendamos o armazenamento a –20 °C.

# Protocolo: Purificação de ADN e ARN virais a partir de soro, plasma ou LCR

## Aspectos importantes antes do início do procedimento

- Se estiver a utilizar o EZ1 DSP Virus Kit pela primeira vez, leia as “Notas importantes” (página 23).
- Os cartuchos de reagentes (RCV) contêm sais de guanidina e, por conseguinte, não são compatíveis com reagentes desinfectantes que contenham lixívia. Tome medidas de segurança adequadas e use luvas durante o manuseamento. Consulte a página 6 para obter informações de segurança.
- Efectue todos os passos do protocolo à temperatura ambiente (15–25 °C). Durante o procedimento de configuração, trabalhe rapidamente.
- Depois de receber o kit, verifique se os componentes do mesmo apresentam danos. Se os cartuchos de reagentes (RCV) ou outros componentes do kit estiverem danificados, contacte a Assistência Técnica ou o distribuidor local da QIAGEN. Em caso de derrame de líquido, consulte “Informações sobre segurança” (página 6). Não utilize cartuchos de reagentes (RCV) ou outros componentes do kit danificados, uma vez que a sua utilização poderá resultar num fraco desempenho do kit.
- Em alguns passos do procedimento, pode fazer uma de 2 escolhas. Escolha ▲ (azul) se estiver a utilizar o EZ1 Advanced; escolha ● (vermelho) se estiver a utilizar o BioRobot EZ1 DSP.

## Outros aspectos importantes antes de iniciar o procedimento

- O tampão de lise no cartucho de reagentes (RCV) pode formar um precipitado após o armazenamento. Se necessário, volte a dissolver, aquecendo a 30–40 °C e depois colocando à temperatura ambiente.
- Prepare as amostras de soro ou plasma, tal como descrito em “Preparar as amostras de soro, plasma e LCR”, página 23. Se forem visíveis crioprecipitados nas amostras congeladas, centrifugue a 6800 x g durante 3 minutos, transfira os sobrenadantes para tubos novos sem interferir com os pellets e inicie, imediatamente, o procedimento de purificação.
- Prepare uma solução-mãe de ARN transportador (CARRIER) (com controlo interno [IC] opcional) antes de o utilizar pela primeira vez. Dissolva o ARN transportador (CARRIER) liofilizado em 310 µl de tampão de eluição (AVE) (fornecido no kit) e misture-o com o controlo interno (IC) (opcional), tal como descrito em “Preparar o ARN transportador (CARRIER)” e “Utilizar um controlo interno (IC)”, páginas 23–24.

## Procedimento

1. **Para cada amostra, prepare uma solução de 60  $\mu\text{l}$  contendo 3,6  $\mu\text{l}$  de ARN transportador (CARRIER) dissolvido (com controlo interno [IC] opcional) num tubo (ET) de 1,5 ml (fornecido). Misture suavemente, efectuando a pipetagem da solução 10 vezes. Não leve ao vórtex.**

O tubo (ET) de 1,5 ml é carregado na terceira fila, tal como especificado nas instruções no ecrã.

**i** Certifique-se de que a solução de ARN transportador (CARRIER) está no fundo do tubo (ET) de 1,5 ml, de modo a que a quantidade adequada possa ser transferida pelo EZ1 Advanced ou o BioRobot EZ1 DSP.

2. **Transfira 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$  ou 400  $\mu\text{l}$  de soro ou plasma para tubos de amostra (ST) de 2 ml e estabilize à temperatura ambiente (15–25 °C) antes de efectuar o carregamento na mesa de trabalho. Se utilizar amostras congeladas, descongele e estabilize à temperatura ambiente e misture bem no vórtex.**

**i** Para um desempenho ideal, é essencial que utilize os tubos (ST) de 2 ml fornecidos com o kit.

**i** Não volte a congelar amostras descongeladas nem armazene amostras durante um período superior a 6 horas a 2–8 °C, pois tal resulta em rendimentos significativamente reduzidos dos ácidos nucleicos virais.

Recomendamos a utilização de 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$  ou 400  $\mu\text{l}$  de plasma e soro. Se pretender utilizar uma quantidade inferior de amostra, pode aumentar o volume para 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$  ou 400  $\mu\text{l}$  com a quantidade adequada de tampão de eluição (AVE) (tampão de eluição [AVE] adicional não fornecido; à venda em separado).

**i** Não utilize volumes de amostra superiores a 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$  ou 400  $\mu\text{l}$ . Depois da lise e da ligação dos ácidos nucleicos virais às partículas magnéticas, uma parte do lisado é transferida para o tubo de amostra (ST) para inactivar os vírus residuais. Qualquer amostra deixada no tubo de amostra (ST), depois da transferência de amostras, perder-se-á.

3. **Insira ▲ o cartão EZ1 Advanced DSP Virus totalmente na ranhura do cartão EZ1 Advanced do EZ1 Advanced ou ● o cartão EZ1 DSP Virus totalmente na ranhura do cartão EZ1 do BioRobot EZ1 DSP.**
4. **Ligue a estação de trabalho EZ1 Advanced ou BioRobot EZ1 DSP**  
O interruptor de alimentação está localizado na parte posterior esquerda do instrumento.
5. **Prima "START" para iniciar a configuração da mesa de trabalho do protocolo EZ1 DSP Virus.**

6. Abra a porta da estação de trabalho.
7. Inverta 1 a 6 cartuchos de reagentes (RCV) 3 vezes para misturar as partículas magnéticas. Em seguida, bata ligeiramente nos cartuchos (RCV) para depositar os reagentes no fundo dos respectivos poços.
8. Siga as instruções no ecrã relativas à configuração da mesa de trabalho, selecção da variável do protocolo e ▲ **detecção de dados**.

 Depois de fazer deslizar um cartucho de reagentes (RCV) para o suporte de cartuchos, pressione o cartucho para baixo até ficar devidamente encaixado.

 Se existirem menos de 6 cartuchos de reagentes (RCV), podem ser carregados por qualquer ordem no suporte. Contudo, quando carregar os outros materiais de laboratório, certifique-se de que também seguem a mesma ordem.

▲ Quando utilizar a opção de detecção de dados, certifique-se de que a ID da amostra segue a mesma ordem das amostras na mesa de trabalho para evitar a mistura de dados.

9. Feche a porta da estação de trabalho.
10. Prima "START" para iniciar o protocolo.
11. Quando o protocolo terminar, o ecrã apresenta a indicação "Protocol finished". ▲ Prima "ENT" para gerar o ficheiro de relatório.  
▲ O EZ1 Advanced pode armazenar até 10 ficheiros de relatório. Pode imprimir os ficheiros de relatório directamente numa impressora ligada ou transferi-los para um computador.
12. Abra a porta da estação de trabalho.
13. Retire os tubos de eluição (ET) com os ácidos nucleicos virais purificados da primeira fila. Elimine os resíduos da preparação das amostras.\*
14. ▲ **Opcional: Siga as instruções no ecrã para executar a descontaminação por UV das superfícies da mesa de trabalho.**
15. Efectue o procedimento de manutenção regular, tal como descrito no manual do utilizador fornecido com a estação de trabalho EZ1.  
A manutenção regular tem de ser efectuada no fim de cada execução de protocolo. A mesma consiste na limpeza da unidade de perfuração e das superfícies da mesa de trabalho.  
 A unidade de perfuração é afiada! É recomendada a utilização de luvas duplas.

\* Os resíduos da amostra contêm sais de guanidina e, por conseguinte, não são compatíveis com lixívia. Consultar a página 6 para informações de segurança.

**16. Para executar outro protocolo, prima "START", efectue os passos 1 e 2 do protocolo e, em seguida, siga o protocolo a partir do passo 5. Caso contrário, prima "STOP" duas vezes para regressar ao primeiro ecrã, feche a porta da estação de trabalho e desligue a estação de trabalho EZ1.**

Não é necessário efectuar os passos 3–4 quando executar outro protocolo. Ignore estes passos.

## Guia de resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para obter mais informações, consulte também a página de perguntas frequentes no nosso Centro de Suporte Técnico: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Os cientistas da Assistência Técnica da QIAGEN estão sempre prontos a responder a qualquer questão que possa ter sobre as informações e protocolos constantes neste manual ou sobre as tecnologias de amostragem e ensaio (para informações de contacto, consulte o verso do manual ou visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

### Comentários e sugestões

---

#### Manuseamento geral

Mensagem de erro no ecrã do instrumento

 Consulte o manual do utilizador fornecido com a estação de trabalho EZ1.

#### Baixo rendimento do ADN e ARN virais

a) Ressuspensão incompleta das partículas magnéticas

 Certifique-se de que ressuspende as partículas magnéticas cuidadosamente antes de carregar os cartuchos de reagentes (RCV) no suporte.

b) Aspirado reagente insuficiente

 Depois de inverter os cartuchos de reagentes (RCV) para ressuspender as partículas magnéticas, certifique-se de que bate ligeiramente nos cartuchos (RCV) para depositar os reagentes no fundo dos poços.

c) Reagentes carregados na mesa de trabalho pela ordem errada

 Certifique-se de que todos os tubos (ET, ST) e os porta-pontas (DTH) com as pontas (DFT) estão carregados na mesa de trabalho pela ordem correcta. Repita o procedimento de purificação com novas amostras.

## Comentários e sugestões

---

- d) ARN transportador (CARRIER) não adicionado
- ⓘ Reconstitua o ARN transportador (CARRIER) liofilizado em 310  $\mu$ l de tampão de eluição (AVE). Para cada amostra, utilize 3,6  $\mu$ l desta solução-mãe de ARN transportador (CARRIER), misturado com controlo interno (IC) (opcional) e tampão de eluição (AVE) adicional a um volume final de 60  $\mu$ l, tal como descrito em “Preparar o ARN transportador (CARRIER)” e “Utilizar um controlo interno (IC)”, páginas 23–24. Repita o procedimento de purificação com novas amostras.
- e) ARN transportador (CARRIER) e tampão de eluição (AVE) não misturados suficientemente
- ⓘ Misture ARN transportador (CARRIER), controlo interno (IC) (opcional) e tampão de eluição (AVE) efectuando a pipetagem, pelo menos, 10 vezes.
- f) ARN degradado
- ⓘ O ARN pode ter sido degradado pelas RNases nas amostras de plasma ou soro originais. Certifique-se de que as amostras são processadas imediatamente após a colheita ou remoção do armazenamento.
- g) Precipitados visíveis no fundo dos poços dos cartuchos de reagentes
- ⓘ Coloque os cartuchos de reagentes (RCV) num agitador-incubador e incube a 30–40 °C com agitação suave durante, no máximo, 2 horas. Não utilize os cartuchos de reagentes (RCV) se os precipitados não voltarem a dissolver-se.

### **O ADN ou o ARN não actua favoravelmente em reacções enzimáticas a jusante**

- a) Pouco ou nenhum ácido nucleico no eluato
- ⓘ Consulte “Baixo rendimento do ADN e ARN virais”, página 36, para saber quais as razões possíveis. Aumente a quantidade de eluato adicionado à reacção enzimática a jusante, se possível.

## Comentários e sugestões

---

- b) Amostras de soro ou plasma congeladas não misturadas devidamente após a descongelação
- ⓘ Descongele as amostras congeladas à temperatura ambiente (15–25 °C) e misture no vórtex durante 15 segundos.
- c) Ácidos nucleicos nas amostras já degradados antes da purificação
- ⓘ Isto pode acontecer se as amostras tiverem sido novamente congeladas após descongeladas uma vez ou armazenadas à temperatura ambiente durante demasiado tempo. Utilize sempre amostras recém-colhidas ou amostras descongeladas apenas uma vez. Repita o procedimento de purificação com novas amostras.
- d) Lise de amostra insuficiente
- ⓘ Isto pode acontecer se os cartuchos de reagentes (RCV) tiverem sido armazenados a temperaturas elevadas durante demasiado tempo, levando à inactivação da proteinase K. Repita o procedimento de purificação utilizando amostras e cartuchos de reagentes (RCV) novos.
- e) "Carry-over" de sal durante a eluição
- ⓘ Para melhores resultados, certifique-se de que os cartuchos de reagentes (RCV) se encontram a 20–30 °C.
- f) Demasiado ou muito pouco ARN transportador (CARRIER) no eluato
- ⓘ Determine a quantidade máxima de ARN transportador (CARRIER) adequada para a reacção de amplificação. Ajuste a concentração da solução de ARN transportador (CARRIER).
- g) Demasiado eluato na reacção de amplificação
- ⓘ Determine o volume máximo de eluato adequado para a reacção de amplificação. Reduza o volume de eluato adicionado à reacção de amplificação ou aumente o volume de eluição em conformidade. Se pretender, pode adicionar um controlo positivo ao eluato para determinar o efeito do eluato na reacção de amplificação.

## Comentários e sugestões

---

- h) Desempenho variável dos ácidos nucleicos purificados em ensaios a jusante
- ⓘ Os componentes de etanol e sal do tampão de lavagem 1 ou do tampão de lavagem 2 no cartucho (RCV) podem ter-se separado devido ao armazenamento a longo prazo. Agite sempre os cartuchos (RCV) cuidadosamente e bata ligeiramente nos mesmos antes de iniciar um procedimento de purificação.
- i) Ausência de sensibilidade devido a substâncias inibidoras
- ⓘ Aumente o volume de eluição. Se pretender, pode adicionar um controlo positivo ao eluato para determinar o efeito do volume de eluição na reacção de amplificação.
- j) Nova combinação de transcriptase inversa e Taq ADN polimerase
- ⓘ Se as enzimas forem alteradas, pode ser necessário reajustar a quantidade de ARN transportador (CARRIER) adicionado ao tampão de eluição (AVE) e a quantidade de eluato utilizada.
- k) "Carry-over" de partículas magnéticas
- ⓘ O "carry-over" de partículas magnéticas nos eluatos não afectará a maioria das aplicações a jusante, incluindo a RT-PCR. Se for necessário reduzir o risco de "carry-over" de partículas magnéticas (por exemplo, para aplicações tais como a PCR em tempo real), coloque primeiro os tubos que contêm eluato num íman adequado (por exemplo, o 12-Tube Magnet [n.º cat. 36912]) durante 1 minuto e, em seguida, transfira os eluatos para tubos limpos. Se não estiver disponível um íman adequado, centrifugue os tubos que contêm os eluatos numa microcentrífuga à velocidade máxima durante 1 minuto para formar um pellet de todas as partículas magnéticas restantes e transfira os sobrenadantes para tubos limpos.

## Apêndice A: Apresentação de mensagens

As mensagens apresentadas pelo protocolo do software durante a configuração da mesa de trabalho, durante a execução do protocolo e após a execução do protocolo são apresentadas na Tabela 9 para o EZ1 Advanced e na Tabela 10 para o BioRobot EZ1. Os números das mensagens apresentadas nas tabelas abaixo correspondem aos números das mensagens apresentadas pelo software.

Para obter informações sobre as mensagens de erro gerais apresentadas no EZ1 Advanced ou no BioRobot EZ1 DSP, consulte o manual do utilizador fornecido com a estação de trabalho EZ1.

**Tabela 9. Mensagens apresentadas no procedimento do EZ1 Advanced DSP Virus**

<b>Número da mensagem</b>	<b>Tipo de mensagem</b>	<b>Texto da mensagem do EZ1 Advanced</b>
Nenhum	Orientação	Date/Time START:Run 1: UV 2: Man 3: Test 4: Setup Key: START, 1, 2, 3, 4
1	Orientação	EZ1 Advanced DSP Virus Version 1.0
2	Detecção de dados	Scan/enter user ID
3	Detecção de dados	Scan/enter Q-Card bar code
4	Orientação	Wrong kit! Please load EZ1 DSP Virus Kit ENT=back
5	Orientação	Kit expired ENT: Use new kit ESC: Stop protocol
6	Detecção de dados	Use Q-Card data with sample no. 1 to Enter 1 to 6
7	Orientação	Do you want to process more samples with another kit lot ENT: Yes, ESC: no

A tabela continua na página seguinte.

**Tabela 9. Continuação**

<b>Número da mensagem</b>	<b>Tipo de mensagem</b>	<b>Texto da mensagem do EZ1 Advanced</b>
8	Detecção de dados	Do you want to add sample ID? ENT: Yes ESC: No
9	Detecção de dados	Scan/enter sample ID sample no. [x]
10	Detecção de dados	ID1: ID2: ID3: Next=ENT
11	Detecção de dados	ID4: ID5: ID6: Next=ENT, ID1-3=Up
12	Detecção de dados	12) Do you want to add assay information? ENT: Yes, ESC: No
13	Detecção de dados	Scan/enter assay ID ID sample no. [x]
14	Detecção de dados	Do you want to add notes? ENT: Yes ESC: No
15	Detecção de dados	Scan/enter notes sample no. [x]
16	Orientação	Select sample volume: 1: 100 ul 2: 200 ul 3: 400 ul
17	Orientação	Select elution volume: 1: 60 ul 2: 90 ul 3: 120 ul 4: 150 ul

A tabela continua na página seguinte.

**Tabela 9. Continuação**

<b>Número da mensagem</b>	<b>Tipo de mensagem</b>	<b>Texto da mensagem do EZ1 Advanced</b>
18	Orientação	You have chosen: Sample volume: [xxx] ul Elution volume: [yyy] ul Next=Any, Prev=Esc
19	Orientação	Load cartridges at same positions as sample Next=Any, Prev=Esc
20	Orientação	Load empty 2.0 ml tubes at heating block Next=Any, Prev=Esc
21	Orientação	Load elution tubes (1.5 ml) into first row Next=Any, Prev=Esc
22	Orientação	Load tip holders and tips into second row Next=Any, Prev=Esc
23	Orientação	Load 1.5 ml tubes containing cRNA and IC in third row Next=Any, Prev=Esc
24	Orientação	Load 2.0 ml tubes with sample in fourth row Next=Any, Prev=Esc
25	Orientação	Loading finished. Close door and press START  Prev=Esc
26	Orientação	Please close door!
27	Orientação	Checking temperature Set: Cur:
28	Estado	Protocol started
29	Estado	Piercing foil
30	Estado	Collecting Elution Buffer AVE
31	Estado	Collecting cRNA + IC

A tabela continua na página seguinte.

**Tabela 9. Continuação**

<b>Número da mensagem</b>	<b>Tipo de mensagem</b>	<b>Texto da mensagem do EZ1 Advanced</b>
32	Estado	Collecting Lysis Buffer
33	Estado	Collecting Sample
34	Estado	Collecting Proteinase K
35	Estado	Mixing Lysate
36	Estado	15 min Incubation [x] of 43 min left
37	Estado	Kick [x] of 43 min left
38	Estado	Collecting Binding Buffer [x] of 43 min left
39	Estado	Collecting Lysis Buffer [x] of 43 min left
40	Estado	Collecting Beads [x] of 43 min left
41	Estado	Resuspension of Beads in Binding Buffer [x] of 43 min left
42	Estado	Transferring Lysate [x] of 43 min left
43	Estado	Binding Magnetic Separation [x] of 43 min left
44	Estado	Wash 1 Magnetic Separation [x] of 43 min left
45	Estado	Wash 2 Magnetic Separation [x] of 43 min left

A tabela continua na página seguinte.

**Tabela 9. Continuação**

<b>Número da mensagem</b>	<b>Tipo de mensagem</b>	<b>Texto da mensagem do EZ1 Advanced</b>
46	Estado	Wash 3 Magnetic Separation [x] of 43 min left
47	Estado	Dry Beads [x] of 43 min left
48	Estado	Rinse [x] of 43 min left
49	Estado	Elution [x] of 43 min left
50	Orientação	Check transfer of cRNA + IC (row 3) Next=Any
51	Orientação	Check transfer of sample (row 4) Next=Any
52	Orientação	Protocol finished
53	Deteccção de dados	Transfer Report file, attempt no.
54	Orientação	Report file sent Next=ENT
55	Orientação	Report file could not be sent Resend=ENT
56	Orientação	Perform UV run? ENT: Yes ESC: No
57	Orientação	UV decontamination Set time min Key:0-9, ENT

A tabela continua na página seguinte.

**Tabela 9. Continuação**

<b>Número da mensagem</b>	<b>Tipo de mensagem</b>	<b>Texto da mensagem do EZ1 Advanced</b>
58	Orientação	UV decontamination. Time must be between 20-60 min Key:ESC
59	Orientação	UV decontamination Time left: min
60	Orientação	Perform regular maintenance after each run ESC=Main menu
61	Orientação	UV lamp expires soon UV runs left: ENT=continue
62	Orientação	UV lamp is expired ENT=continue ESC=abort
63	Orientação	Decontamination UV lamp cooling Please stand by

**Tabela 10. Mensagens apresentadas no procedimento do BioRobot EZ1 DSP Virus**

<b>Número da mensagem</b>	<b>Tipo de mensagem</b>	<b>Texto da mensagem do BioRobot EZ1 DSP</b>
Nenhum	Orientação	Choose button: START: Protocols 1: Tools 2: Tests
1	Orientação	BioRobot EZ1 DSP Virus Version
2	Orientação	Select sample volume: 1: 100ul 2: 200ul 3: 400ul

A tabela continua na página seguinte.

**Tabela 10. Continuação**

<b>Número da mensagem</b>	<b>Tipo de mensagem</b>	<b>Texto da mensagem do BioRobot EZ1 DSP</b>
3	Orientação	Select elution volume: 1: 60ul 2: 90ul 3: 120ul 4: 150ul
4	Orientação	You have chosen: Sample Volume:[sample volume]ul Elution Volume:[elution volume]ul Next=Any, Prev=ESC
5	Orientação	Load cartridges (RCV) at same positions as samples Next=Any, Prev=ESC
6	Orientação	Load empty 2.0ml tubes (ST) at heating block Next=Any, Prev=ESC
7	Orientação	Load elution tubes (ET) (1.5ml) into first row Next=Any, Prev=ESC
8	Orientação	Load tip holders (DTH) and tips (DFT) into second row Next=Any, Prev=ESC
9	Orientação	Load 1.5ml tubes (ET) with (CARRIER) + IC in third row Next=Any, Prev=ESC
10	Orientação	Load 2.0ml tubes (ST) with sample in fourth row Next=Any, Prev=ESC
11	Orientação	Start protocol Press START Prev=ESC
12	Estado	Checking Temperature Set: 63.0 [deg] Cur: [deg]
13	Estado	Protocol started

A tabela continua na página seguinte.

**Tabela 10. Continuação**

<b>Número da mensagem</b>	<b>Tipo de mensagem</b>	<b>Texto da mensagem do BioRobot EZ1 DSP</b>
14	Estado	Piercing Foil
15	Estado	Collecting Elution Buffer (AVE)
16	Estado	Collecting cRNA (CARRIER) + IC
17	Estado	Collecting Lysis Buffer
18	Estado	Collecting Sample
19	Estado	Collecting
20	Estado	Mixing Lysate
21	Estado	Checking Temperature Set: 56.0 [deg] Cur: [deg]
22	Estado	15 min Incubation
23	Estado	Kick
24	Estado	Collecting Binding Buffer
25	Estado	Collecting Lysis Buffer
26	Estado	Collecting Beads
27	Estado	Resuspension of Beads in Binding Buffer
28	Estado	Transferring Lysate
29	Estado	Binding Magnetic Separation
30	Estado	Wash 1 Magnetic Separation
31	Estado	Wash 2 Magnetic Separation
32	Estado	Wash 3 Magnetic Separation
33	Estado	Dry Beads
34	Estado	Kick
35	Estado	Dry Beads

A tabela continua na página seguinte.

**Tabela 10. Continuação**

<b>Número da mensagem</b>	<b>Tipo de mensagem</b>	<b>Texto da mensagem do BioRobot EZ1 DSP</b>
36	Estado	Kick
37	Estado	Rinse
38	Estado	Checking Temperature Set: 65.0 [deg] Cur: [deg]
39	Estado	Elution
40	Orientação	Check transfer of cRNA (CARRIER)+ IC (tube [ET], row 3) Next=Any
41	Orientação	Check transfer of sample (tube [ST], row 4) Next=Any
42	Orientação	Protocol finished! Press ESC to return to Menu

## Apêndice B: Calcular a quantidade de controlo interno (IC)

Para monitorizar a eficiência da preparação de amostras e do ensaio para aplicação a jusante, poderá ser necessário adicionar um controlo interno (IC) ao processo de preparação de amostras. Para calcular a quantidade de controlo interno (IC) necessário no protocolo EZ1 DSP Virus, deve ser tido em consideração o volume do tampão que contém o IC adicionado por amostra e o volume de eluição para um determinado ensaio.

### Determinar a quantidade de controlo interno (IC) que estará presente em reacções a jusante

Para determinar o volume de controlo interno (IC) que estará presente num determinado ensaio a jusante, utilize a fórmula:

$$IC_{RXN} = \frac{IC_{LB} \times LB_{SAM} \times EL_{RXN}}{(LB_{TOT} + IC_{LB}) \times EL_{SAM}}$$

em que:

$IC_{RXN}$  = Volume de controlo interno (IC) por reacção a jusante

$IC_{LB}$  = Volume de controlo interno (IC) adicionado ao tampão de lise (LB)

$LB_{SAM}$  = Volume do tampão de lise (LB) por amostra

$EL_{RXN}$  = Volume do eluato por reacção a jusante

$LB_{TOT}$  = Volume total do tampão de lise (LB) mais ARN transportador (CARRIER) utilizado no protocolo

$EL_{SAM}$  = Volume do eluato por amostra

Exemplificando e utilizando um sistema de ensaio anteriormente estabelecido, o Utilizador 1 adiciona 39 µl de solução de controlo interno (ICLB) a 8,4 ml de tampão de lise (LB) e 140 µl de ARN transportador (CARRIER). Utilizando o procedimento de referência manual para o sistema de ensaio, são adicionados 625 µl do tampão de lise (LB) por amostra ( $LB_{SAM}$ ) e é utilizado um volume de eluição de 75 µl ( $EL_{SAM}$ ). O Utilizador 1 usa 50 µl de eluato por reacção a jusante ( $EL_{RXN}$ ). O volume da solução de controlo interno em cada reacção a jusante ( $IC_{RXN}$ ) é de:

$$IC_{RXN} = \frac{39 \mu l \times 625 \mu l \times 50 \mu l}{(8540 \mu l + 39 \mu l) \times 75 \mu l} = 1,89 \mu l$$

As reacções finais a jusante para o sistema de ensaio em questão contêm 1,89 µl de solução de controlo interno por reacção.

## Determinar a quantidade de solução de controlo interno a adicionar antes de começar

Se souber a quantidade de controlo interno (IC) que pretende que esteja presente no ensaio a jusante ( $IC_{RXN}$ ), nesse caso precisa de determinar a quantidade de controlo interno (IC) a diluir com o tampão de eluição (AVE) e o ARN transportador (CARRIER) ( $IC_{AVE}$ ) antes de iniciar a purificação. Para calcular este valor, utilize a fórmula:

$$IC_{AVE} = \frac{IC_{RXN} \times IC_{TOT} \times EL_{SAM}}{IC_{SAM} \times EL_{RXN}}$$

em que:

- $IC_{AVE}$  = Volume de controlo interno (IC) diluído em tampão de eluição–ARN transportador (AVE–CARRIER)
- $IC_{RXN}$  = Volume de controlo interno (IC) por reacção a jusante
- $IC_{TOT}$  = Volume total de controlo interno (IC) diluído em tampão de eluição–ARN transportador (AVE–CARRIER) por execução
- $IC_{SAM}$  = Volume de controlo interno (IC) diluído adicionado por amostra (50  $\mu$ l)
- $EL_{SAM}$  = Volume de eluato por amostra
- $EL_{RXN}$  = Volume de eluato por reacção a jusante

Exemplificando, o Utilizador 2 encontra-se a trabalhar com um ensaio optimizado para utilizar 1,0  $\mu$ l de solução de controlo interno por reacção ( $IC_{RXN}$ ) e 20  $\mu$ l de eluato por reacção ( $EL_{RXN}$ ). O Utilizador 2 segue o protocolo EZ1 DSP Virus, tendo sido seleccionado um volume de eluição de 60  $\mu$ l ( $EL_{SAM}$ ). Para cada amostra processada, é necessário pipetar manualmente um volume de 60  $\mu$ l de controlo interno (IC) diluído no tubo (ET) de 1,5 ml na posição 3 da mesa da estação de trabalho EZ1 DSP, mas durante o processo de preparação de amostras do protocolo EZ1 DSP Virus, a estação de trabalho EZ1 Advanced ou BioRobot EZ1 DSP transferirá apenas 50  $\mu$ l de controlo interno diluído ( $IC_{SAM}$ ) do poço 3 para a reacção de ligação. Para 6 amostras a serem processadas numa execução, deve ser obtido um volume total de controlo interno diluído ( $IC_{TOT}$ ) de:

$$\begin{aligned} IC_{TOT} &= \text{Número de amostras por execução} \times 60 \mu\text{l} \\ &= 6 \times 60 \mu\text{l} = 360 \mu\text{l} \end{aligned}$$

O volume da solução de controlo interno ( $IC_{AVE}$ ) que o Utilizador 2 necessita para 6 amostras é:

$$IC_{AVE} = \frac{1 \mu l \times 360 \mu l \times 60 \mu l}{(50 \mu l \times 20 \mu l)} = 21,6 \mu l$$

Para cada amostra, é necessário adicionar  $3,6 \mu l$  da solução-mãe de ARN transportador (CARRIER) com  $1 \mu g/\mu l$  à diluição de IC. Para 6 amostras, o volume total tem de ser calculado da seguinte forma:

Volume total da solução-mãe de ARN transportador =  $6 \times 3,6 \mu l$  de solução-mãe de ARN transportador =  $21,6 \mu l$

Para um volume total final de  $360 \mu l$  de controlo interno (IC) diluído, o utilizador tem de adicionar tampão de eluição (AVE):

$$\begin{aligned} \text{Volume do tampão de eluição (AVE)} &= IC_{TOT} - IC_{AVE} - \text{Volume de ARN} \\ &\quad \text{transportador (CARRIER)} \\ &= 360 \mu l - 21,6 \mu l - 21,6 \mu l = \\ &\quad 316,8 \mu l \end{aligned}$$

O Utilizador 2 necessita de adicionar  $21,6 \mu l$  de solução de controlo interno a  $316,8 \mu l$  de tampão de eluição (AVE) e  $21,6 \mu l$  de solução-mãe de ARN transportador (CARRIER) para obter  $360 \mu l$  de controlo interno (IC) diluído. Deste controlo interno (IC) diluído,  $60 \mu l$  têm de ser transferidos manualmente para tubos (ET) de  $1,5 \text{ ml}$  na posição 3 da mesa de trabalho do EZ1 Advanced ou do BioRobot EZ1 DSP antes de iniciar o protocolo EZ1 DSP Virus.

# Apêndice C: Folha de amostra para utilizar com o BioRobot EZ1 DSP

Este modelo de folha de amostra pode ser útil para guardar os registos quando utilizar o procedimento do EZ1 DSP Virus. Esta folha pode ser fotocopiada e identificada com descrições das amostras e detalhes da execução.

Data/hora: \_\_\_\_\_ Número do lote do kit: \_\_\_\_\_  
 Operador: \_\_\_\_\_ ID da execução: \_\_\_\_\_  
 Número de série da estação de trabalho: \_\_\_\_\_

Posição	Amostra	Verificação da carga	Comentários
1		<input type="checkbox"/> Cartucho de reagentes (RCV) (esquerda) <input type="checkbox"/> Tubo de amostra (ST) (bloco de aquecimento) <input type="checkbox"/> Tubo de eluição (ET) <input type="checkbox"/> Porta-pontas (DTH) com ponta (DFT) <input type="checkbox"/> Tubo de eluição (ET) com ARN transportador (CARRIER) e IC	
2		<input type="checkbox"/> Tubo de amostra (ST) com amostra <input type="checkbox"/> Cartucho de reagentes (RCV) <input type="checkbox"/> Tubo de amostra (ST) (bloco de aquecimento) <input type="checkbox"/> Tubo de eluição (ET) <input type="checkbox"/> Porta-pontas (DTH) com ponta (DFT) <input type="checkbox"/> Tubo de eluição (ET) com ARN transportador (CARRIER) e IC	
3		<input type="checkbox"/> Tubo de amostra (ST) com amostra <input type="checkbox"/> Cartucho de reagentes (RCV) <input type="checkbox"/> Tubo de amostra (ST) (bloco de aquecimento) <input type="checkbox"/> Tubo de eluição (ET) <input type="checkbox"/> Porta-pontas (DTH) com ponta (DFT) <input type="checkbox"/> Tubo de eluição (ET) com ARN transportador (CARRIER) e IC	
4		<input type="checkbox"/> Tubo de amostra (ST) com amostra <input type="checkbox"/> Cartucho de reagentes (RCV) <input type="checkbox"/> Tubo de amostra (ST) (bloco de aquecimento) <input type="checkbox"/> Tubo de eluição (ET) <input type="checkbox"/> Porta-pontas (DTH) com ponta (DFT) <input type="checkbox"/> Tubo de eluição (ET) com ARN transportador (CARRIER) e IC	
5		<input type="checkbox"/> Tubo de amostra (ST) com amostra <input type="checkbox"/> Cartucho de reagentes (RCV) <input type="checkbox"/> Tubo de amostra (ST) (bloco de aquecimento) <input type="checkbox"/> Tubo de eluição (ET) <input type="checkbox"/> Porta-pontas (DTH) com ponta (DFT) <input type="checkbox"/> Tubo de eluição (ET) com ARN transportador (CARRIER) e IC	
6 (direita)		<input type="checkbox"/> Tubo de amostra (ST) com amostra <input type="checkbox"/> Cartucho de reagentes (RCV) <input type="checkbox"/> Tubo de amostra (ST) (bloco de aquecimento) <input type="checkbox"/> Tubo de eluição (ET) <input type="checkbox"/> Porta-pontas (DTH) com ponta (DFT) <input type="checkbox"/> Tubo de eluição (ET) com ARN transportador (CARRIER) e IC <input type="checkbox"/> Tubo de amostra (ST) com amostra	

## Apêndice D: Exemplo de um ficheiro de relatório do EZ1 Advanced

Neste apêndice é apresentado um ficheiro de relatório normal gerado no EZ1 Advanced. Os valores para cada parâmetro irão diferir dos do ficheiro de relatório gerado no seu EZ1 Advanced.

Ficheiro de relatório do EZ1 Advanced:

Serial No. EZ1 Advanced: ..... "123456789"  
User ID: ..... "964"  
Firmware version: ..... "V 1.0.0"  
Installation date of instrument: ..... " , "  
Weekly maintenance done on: ..... "Feb 26, 2008"  
Yearly maintenance done on: ..... "Nov 06, 2007"  
Date of last UV-run: ..... "Mar 03, 2008"  
Start of last UV-run: ..... "14:48"  
End of last UV-run: ..... "14:52"  
Status of last UV-run: ..... "UV run aborted"

Protocol name: ..... "Virus DSP"  
..... "Version 1.0"

Date of run: ..... "Mar 03, 2008"  
Start of run: ..... "14:54"  
End of run: ..... "15:40"  
Status run: ..... "o.k"  
Error Code: ..... "\_\_\_"  
Sample input Volume [ul]: ..... " 400"  
Elution volume[ul]: ..... " 60"

Channel A:  
Sample ID: ..... "717"  
Reagent Kit number: ..... "9801401"  
Reagent Lot number: ..... "1181234567"  
Reagent Expiry date: ..... "1210"  
Assay Kit ID: ..... "717"  
Note: ..... "717"

Channel B:  
Sample ID: ..... "393"  
Reagent Kit number: ..... "9801401"  
Reagent Lot number: ..... "1181234567"  
Reagent Expiry date: ..... "1210"  
Assay Kit ID: ..... "393"  
Note: ..... "393"

Channel C:  
Sample ID: ..... "163"  
Reagent Kit number: ..... "9801401"  
Reagent Lot number: ..... "1181234567"  
Reagent Expiry date: ..... "1210"  
Assay Kit ID: ..... "163"  
Note: ..... "163"

Channel D:  
Sample ID: ..... "149"  
Reagent Kit number: ..... "9801401"  
Reagent Lot number: ..... "1181234567"  
Reagent Expiry date: ..... "1210"  
Assay Kit ID: ..... "149"  
Note: ..... "149"

Channel E:  
Sample ID: ..... "719"  
Reagent Kit number: ..... "9801401"  
Reagent Lot number: ..... "1181234567"  
Reagent Expiry date: ..... "1210"  
Assay Kit ID: ..... "719"  
Note: ..... "719"

Channel F:  
Sample ID: ..... "407"  
Reagent Kit number: ..... "9801401"  
Reagent Lot number: ..... "1181234567"  
Reagent Expiry date: ..... "1210"  
Assay Kit ID: ..... "407"  
Note: ..... "407"

[Checksum E95974AC]

## Referências

A QIAGEN mantém uma abrangente base de dados online actualizada de publicações científicas que utilizam produtos QIAGEN. As opções de pesquisa avançada permitem localizar os artigos de que necessita, quer através da pesquisa por uma única palavra-chave, quer especificando a aplicação, área de investigação, título, etc.

Para obter uma lista completa de referências, visite a base de dados de referências da QIAGEN online em [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) ou contacte a Assistência Técnica ou o distribuidor local da QIAGEN.

## Informações para encomenda

Produto	Conteúdo	N.º cat.
EZ1 DSP Virus Kit (48)	Para 48 preparações de ácidos nucleicos virais: Cartuchos de reagentes enchidos previamente, porta-pontas descartáveis, pontas com filtros descartáveis, tubos de amostra, tubos de eluição, tampões, ARN transportador	62724
Cartão EZ1 Advanced DSP Virus	Cartão pré-programado para o protocolo EZ1 DSP Virus; para utilizar com a estação de trabalho EZ1 Advanced	9018306
Cartão EZ1 DSP Virus	Cartão pré-programado para o protocolo EZ1 DSP Virus; para utilizar com a estação de trabalho BioRobot EZ1 DSP	9017707
EZ1 Advanced	Estação robótica para a purificação automatizada de ácidos nucleicos utilizando os kits EZ1, garantia de 1 ano em peças e mão-de-obra*	9001411

Visite [www.qiagen.com/products/assays](http://www.qiagen.com/products/assays) para obter mais informações sobre as tecnologias de ensaio da QIAGEN!

\* Garantia PLUS 2 (n.º cat. 9237720) recomendada: Garantia de 3 anos, 1 visita de manutenção preventiva por ano, resposta prioritária em 48 horas, toda a mão de obra, deslocamento e peças de reparação.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Marcas comerciais: QIAGEN®, artus®, EZ1® (QIAGEN Group); ABI PRISM® (Applied Biosystems); COBAS®, AMPLICOR® (Roche Molecular Systems, Inc., concedida sob licença à Roche Diagnostic Systems, Inc.); LightCycler® (Roche); MONITOR® (Roche Group); OptiQuant® (AcroMetrix Corporation); Rotor-Gene™ 3000 (Corbett-Research).

#### **Acordo de Licença Limitada**

A utilização deste produto significa o acordo de qualquer comprador ou utilizador do EZ1 DSP Virus Kit para os seguintes termos:

1. O EZ1 DSP Virus Kit pode ser usado somente de acordo com o *Manual do EZ1 DSP Virus Kit* e apenas para utilização com os componentes contidos no Kit. A QIAGEN não concede nenhuma licença ao abrigo de qualquer da sua propriedade intelectual para utilizar ou incorporar os componentes englobados neste Kit com qualquer componente não incluído neste Kit, excepto conforme descrito no *Manual do EZ1 DSP Virus Kit* e quaisquer protocolos adicionais disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. À excepção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não emite qualquer garantia de que este Kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este Kit e os seus componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, renovados ou objecto de revenda.
4. A QIAGEN recusa especificamente qualquer outra licença, expressa ou implícita, à excepção das expressamente declaradas.
5. O comprador e utilizador do Kit concorda em não tomar nem permitir que qualquer outro tome medidas que possam conduzir ou facilitar qualquer dos actos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições deste Acordo de Licença Limitada em qualquer Tribunal e irá recuperar todos os seus custos legais e de investigação, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir este Acordo de Licença Limitada ou qualquer dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao Kit e/ou seus componentes.

Para obter os termos de licença actualizados, consulte [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2008 QIAGEN. Todos os direitos reservados

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

**Australia** ■ Orders 03-9840-9800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

**Austria** ■ Orders 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Technical 0800/28-10-11

**Belgium** ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

**Canada** ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

**China** ■ Orders 0086 21 3865 3865 ■ Fax 0086 21 3865 3965 ■ Technical 800 988 0325, 800 988 0327

**Denmark** ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

**Finland** ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

**France** ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

**Germany** ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

**Hong Kong** ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

**Ireland** ■ Orders 1800-555-049 ■ Fax 1800-555-048 ■ Technical 1800-555-061

**Italy** ■ Orders 02-33430411 ■ Fax 02-33430426 ■ Technical 800-787980

**Japan** ■ Telephone 03-5547-0811 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-5547-0811

**Luxembourg** ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

**The Netherlands** ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

**Norway** ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

**Singapore** ■ Orders 65-67775366 ■ Fax 65-67785177 ■ Technical 65-67775366

**South Korea** ■ Orders 1544 7145 ■ Fax 1544 7146 ■ Technical 1544 7145

**Spain** ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

**Sweden** ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

**Switzerland** ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

**UK** ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

**USA** ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

