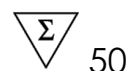


Agosto 2018

Manual do kit QIAamp[®] DSP Virus



O kit QIAamp DSP Virus é um sistema genérico que utiliza a tecnologia QIAamp para isolar e purificar ácidos nucleicos virais de amostras de plasma ou soro humanos para procedimentos de diagnóstico *in vitro*.

Para uso em diagnóstico *in vitro*

IVD



REF

60704



1114514PTBR



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

EC REP



R3 MAT

1024585

Conteúdo

Conteúdo do kit	3
Símbolos	4
Armazenagem.....	5
Controle de qualidade	5
Uso previsto	5
Limitações de uso do produto	6
Avisos e precauções	6
Introdução.....	9
Princípio e procedimento	12
Equipamento e reagentes a serem fornecidos pelo usuário	15
Notas importantes.....	16
Pontos importantes antes de iniciar	16
Preparo de RNA.....	17
Armazenamento de amostras.....	17
Preparação de reagentes e tampões.....	17
Eluição de ácidos nucleicos virais	20
Rendimento e qualidade dos ácidos nucleicos virais	21
Montagem do sistema de vácuo QIAvac 24 Plus	21
Protocolo: Isolamento e purificação de ácidos nucleicos virais de plasma e soro.....	24
Histórico de revisão.....	29

Conteúdo do kit












QIAamp DSP Virus Kit				
N.º de Ref.º				60704
Número de preparações				50
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (Colunas QIAamp MinElute com tubos de lavagem) (WT) (2 ml)	COL		50
EXT	Column Extenders (Extensores de 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 (Tubos de lavagem) (2 ml)	WASH	TUBE	50
AL	Lysis Buffer (Tampão de lise)*	LYS	BUF	33 ml
AW1	Wash Buffer 1 (concentrate) (Tampão de lavagem 1 (concentrado))*	WASH	BUF 1 CON	19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (concentrate) (Tampão de lavagem 2 (concentrado))†	WASH	BUF 2 CON	13 ml
AVE	Elution Buffer (purple caps) (Tampão de eluição (tampas roxas))‡	ELU	BUF	4 x 2 ml
PS	Protease Solvent (Solvente de protease)‡	QPROT	SOLV	4,4 ml
Transportador	Carrier RNA (red caps) (RNA do transportador (tampas vermelhas))	CAR	RNA	310
QP	QIAGEN® Protease	QPROT		1 frasco
	CD			1
	Manual			1

* Contém cloridrato de guanidina. Não compatível com desinfetantes que contêm alvejante. Consulte a página 6 para obter informações de segurança.

† Contém azida sódica como conservante.

‡ Volume de ressuspensão de 4,4 ml.

Símbolos

	Kit com reagentes para a preparação de 50 amostras
	Consultar a informação fornecida no manual
	Para ser utilizado por
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
REF	Referência
LOT	Número do lote
MAT	Número do material
COMP	Componentes
VOL	Volume
	Limites de temperatura
	Na chegada
	Fabricante legal
	Nota importante
	Trocar luvas após cada passo do protocolo com este símbolo
	Abra na entrega; conserve as colunas para centrifugação QIAamp Mini Spin Columns entre 2 e 8 °C
GTIN	Número Global de Item Comercial
	Anote a data atual depois de adicionar etanol ao frasco
EtOH	
ADD	Adição
CONT	Contém
LYOPH	Liofilizado
RCNS	Reconstituir em
EtOH	Etanol
GuHCl	Cloridrato de guanidina
MALEIC ACID	Ácido maleico
SUBT	Subtilisina
	Leva a

Armazenagem

As colunas QIAamp MinElute devem ser conservadas entre 2 e 8 °C após a entrega.

Todos os tampões podem ser conservados à temperatura ambiente (15 a 25 °C).

O RNA transportador liofilizado pode ser armazenado à temperatura ambiente até ao fim do prazo de validade. O RNA transportador só pode ser dissolvido em tampão de eluição (AVE); o RNA transportador dissolvido deve ser adicionado imediatamente ao tampão de lise (AL), tal como descrito na página 17. Esta solução deve ser preparada na hora, mantendo-se estável entre 2 e 8 °C por até 48 horas. As partes não usadas do RNA transportador dissolvidas em tampão de eluição (AVE) devem ser congeladas em alíquotas -20 °C.

A protease QIAGEN (QP) liofilizada pode ser conservada à temperatura ambiente até ao fim do prazo de validade sem que isto afete negativamente seu desempenho.

A protease QIAGEN (QP) reconstituída mantém-se estável por até 1 ano, desde que seja conservada entre 2 e 8 °C, mas apenas até o fim do prazo de validade.

O tampão de lavagem 1 (AW1) reconstituído e o tampão de lavagem 2 (AW2) reconstituído permanecem estáveis por até 1 ano quando conservados a temperatura ambiente, mas apenas até o fim do prazo de validade.

Controle de qualidade

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

Uso previsto

O kit QIAamp DSP Virus é um sistema genérico que utiliza a tecnologia QIAamp para isolar e purificar ácidos nucleicos virais de amostras de plasma ou soro humanos para fins de diagnóstico in vitro. Qualquer resultado de diagnóstico gerado a partir da utilização do procedimento de preparação da amostra conjuntamente com qualquer

ensaio de diagnóstico NAT posterior, deve ser interpretado com relação a outros dados clínicos ou laboratoriais.

O produto deve ser utilizado unicamente por profissionais como técnicos e médicos com formação nas técnicas de biologia molecular. Foi pensado para ser utilizado com qualquer aplicação posterior com emprego da amplificação enzimática ou outra modificação do DNA ou RNA, seguida por detecção ou amplificação do sinal. Os ácidos nucleicos virais isolados e purificados podem ser utilizados em ensaios NAT de diagnóstico qualitativo (por exemplo, triagem sanguínea) e quantitativo (por exemplo, monitoramento da carga viral).

Para minimizar irregularidades nos resultados do diagnóstico, o produto destina-se a ser utilizado com um controle interno assim como com controles positivos e negativos durante o processo de preparação de amostras, e amplificação e detecção de amostras de acordo com o ensaio posterior utilizado.

O produto foi pensado para ser utilizado com o sistema de vácuo QIAvac 24 Plus ou com um sistema de vácuo equivalente.

Limitações de uso do produto

O kit não se destina a ser utilizado com sangue, tecidos, medula óssea ou culturas celulares. O kit também não se destina a ser utilizado para isolar e purificar ácidos nucleicos de bactérias, fungos ou parasitas. O desempenho do kit no isolamento e purificação de ácidos nucleicos virais de outros fluidos corporais sem células, como a urina e o LCR, não foi avaliado.

Avisos e precauções

Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre utilize um avental de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (safety data sheets, SDSs). Essas fichas estão disponíveis on-line em formato PDF conveniente e compacto em www.qiagen.com/safety, onde você pode encontrar, visualizar e imprimir SDS para cada kit e componente de kit QIAGEN.

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

da amostra.

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 líquido contendo essas soluções tamponadas for derramado, 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. A contaminação do resíduo líquido com materiais residuais infecciosos é altamente improvável, mas não pode ser excluída completamente. Portanto, o resíduo líquido deve ser considerado infeccioso, e manipulado e descartado de acordo com os regulamentos locais de segurança.

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

AL do tampão



Contém: cloridrato de guanidina; ácido maleico. Aviso! Pode ser prejudicial se ingerido ou inalado. Provoca a irritação da pele. Causa irritação grave nos olhos. Pode causar reação alérgica na pele. Se a irritação nos olhos persistir: Consulte um médico. Retire a roupa contaminada e lave-a, antes de usá-la novamente. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Tampão AW1



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

Protease QIAGEN



Contém: Subtilisina. Perigo! Causa irritação leve da pele. Causa dano grave nos olhos. Se inalado pode causar sintomas de asma ou alergia, ou dificuldades respiratórias. Evite respirar poeira/fumaça/gás/névoa/vapores/spray. Elimine o conteúdo/recipiente em um local de eliminação de resíduos aprovado. Se tiver sintomas respiratórios: Ligue para um CENTRO de ENVENENAMENTO ou médico. SE EM CONTATO COM OS OLHOS: Enxágue cuidadosamente com água por vários minutos. Remova lentes de contato, se presentes e fácil de serem removidas. Continue enxaguando. SE INALADO: Se houver dificuldade para respirar, leve a vítima a um local com ar livre e deixe-a em repouso em uma posição confortável para respirar. Entre em contato imediatamente com um CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES E ENVENENAMENTOS ou médico. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Use proteção respiratória.

Introdução

O kit QIAamp DSP Virus 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 intervalo linear do procedimento QIAamp DSP Virus foi determinado para o RNA do HIV e o DNA do HBV em vários ensaios de diagnóstico posteriores (Tabela 1, Figura 1 e Figura 2).

Tabela 1.-Ensaio de diagnóstico posteriores nos quais o intervalo linear do procedimento QIAamp DSP Virus foi testado

Ensaio	Kit
RT-PCR do RNA do HIV em tempo real	Ensaio TaqMan® e teste cobas® AMPLICOR HIV-1 MONITOR®
PCR do DNA do HBV em tempo real	Ensaio TaqMan e teste cobas AMPLICOR HBV MONITOR®

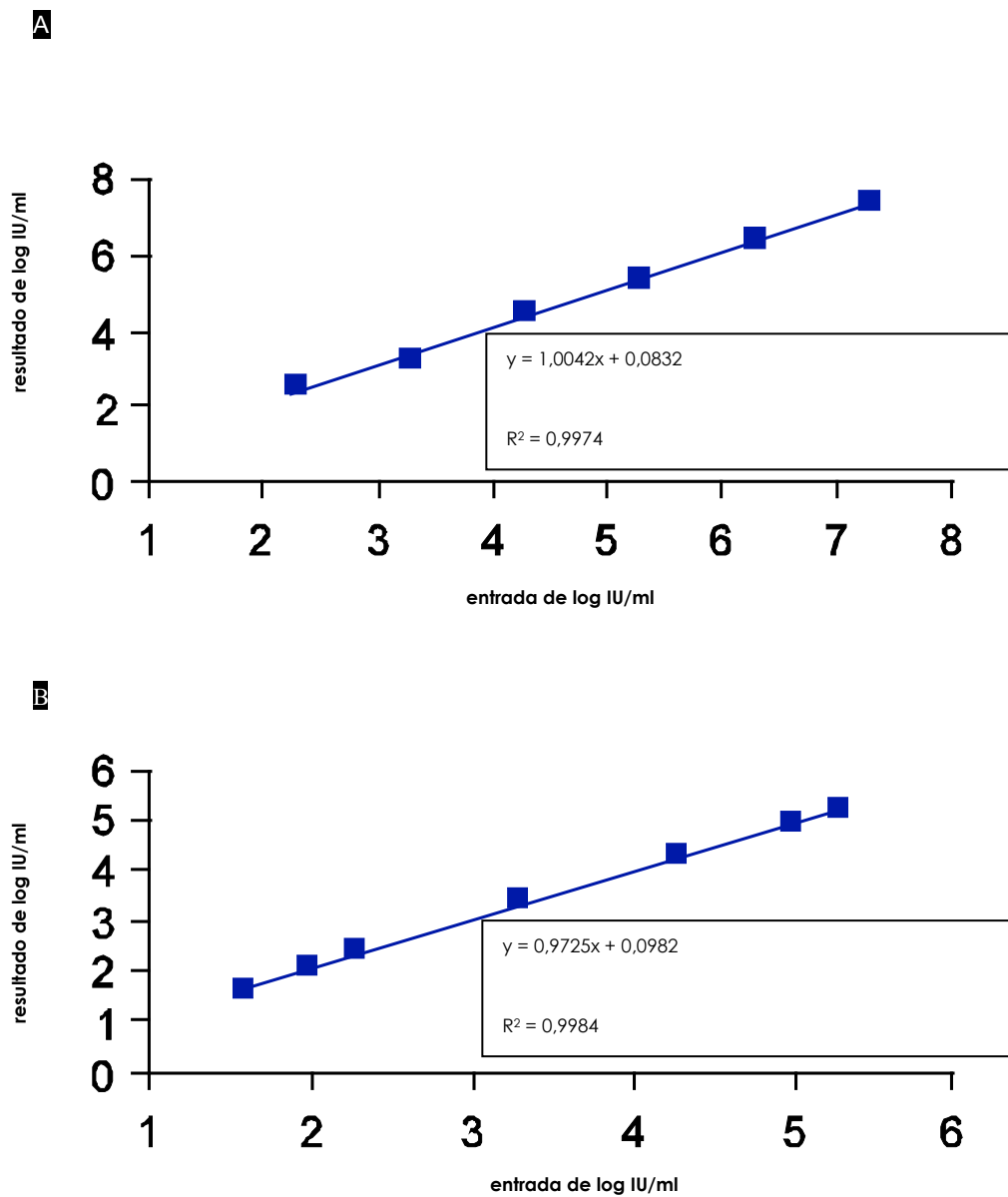


Figura 1. Intervalo linear do procedimento QIAamp DSP Virus utilizando ensaios TaqMan. O intervalo linear do procedimento QIAamp DSP Virus com um volume de eluição de 60 µl foi determinado utilizando ensaios TaqMan para **A** RNA do HIV e **B** DNA do HBV.

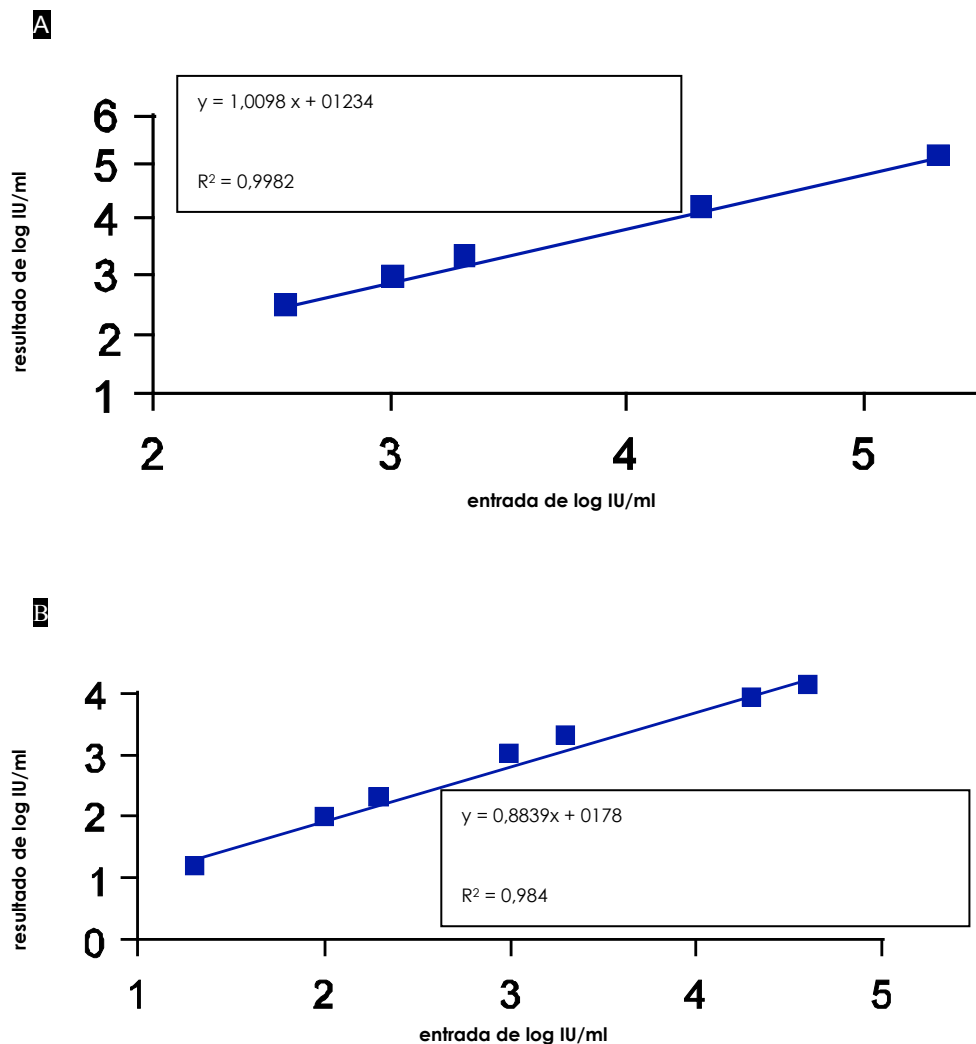


Figura 2. Intervalo linear do procedimento QIAamp DSP Virus utilizando testes cobas AMPLICOR MONITOR. O intervalo linear do procedimento QIAamp DSP Virus com um volume de eluição de 60 µl foi determinado utilizando testes cobas AMPLICOR MONITOR para **A** RNA do HIV e **B** DNA do HBV.

O procedimento é indicado para a utilização 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. O procedimento pode ser utilizado 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 utilização em reações de amplificação ou armazenados a – 20 °C.

Princípio e procedimento

O procedimento QIAamp DSP Virus é composto por 4 passos:

- Lise das partículas do vírus na amostra
- Ligação dos ácidos nucleicos virais no lisado à membrana da coluna QIAamp MinElute
- Lavagem da membrana
- Eluição dos ácidos nucleicos virais da membrana

O procedimento é realizado utilizando colunas QIAamp MinElute em um coletor de vácuo.

Volume de amostra

O limite de detecção (detection limit, DL) e o limite de quantificação (quantification limit, QL), de acordo com as diretrizes da ICH 2QA e 2QB, foram determinados para o procedimento QIAamp DSP Virus (com um volume inicial da amostra de 500 µl e volumes de eluição de 20 µl e 60 µl) utilizando diversos ensaios de diagnóstico posteriores (Tabela 2 e Tabela 3).

Tabela 2.-Limite de detecção do procedimento QIAamp DSP Virus

Ensaio	Volume de eluição	Cut-off de 95%
artus® RealArt™ HBV DNA	20 µl	2,31 IU/ml (n=240)
artus RealArt HCV RNA	20 µl	24,31 IU/ml (n=192)
AMPLICOR manual HIV RNA	60 µl	90,92 IU/ml (n=209)
TaqMan HBV DNA	60 µl	4,73 IU/ml (n=192)

Tabela 3.-Limite de quantificação do procedimento QIAamp DSP Virus

Ensaio	QL	CV
TaqMan HBV DNA	5,7 IU/ml	< 70% (n=88)
TaqMan HIV RNA	52 IU/ml	< 60% (n=88)
cobas AMPLICOR HIV RNA	100 IU/ml	< 60% (n=88)
cobas AMPLICOR HBV DNA	30 IU/ml	< 60% (n=88)
cobas AMPLICOR HCV RNA®	700 IU/ml	< 60% (n=66)

Lise das partículas do vírus

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

Ligação de ácidos nucleicos à membrana da coluna QIAamp MinElute

Para otimizar a ligação do DNA e do RNA viral à membrana da coluna QIAamp MinElute, primeiro adiciona-se etanol aos lisados. A seguir, cada lisado é aplicado na coluna QIAamp MinElute e os ácidos nucleicos virais são adsorvidos para a membrana de gel de sílica à medida que o lisado é escoado por pressão de vácuo.

Remoção de contaminantes residuais

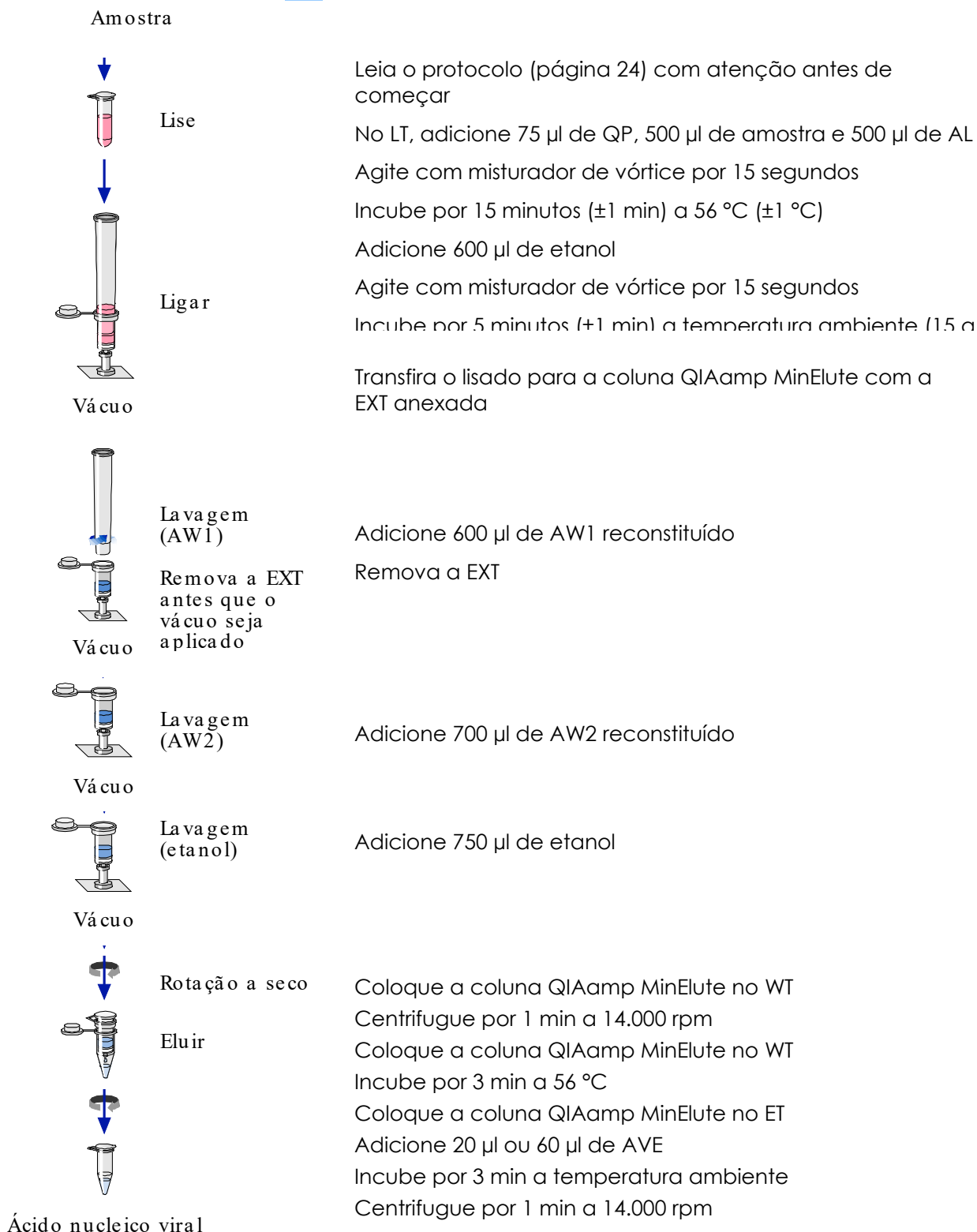
Enquanto os ácidos nucleicos virais permanecem ligados à membrana da coluna QIAamp MinElute, os contaminantes são lavados utilizando primeiramente o tampão de lavagem 1 (AW1), depois o tampão de lavagem 2 (AW2) e depois etanol.

Eluição de ácidos nucleicos puros

Os ácidos nucleicos virais são eluídos da membrana da coluna QIAamp MinElute utilizando o tampão de eluição (AVE). As colunas QIAamp MinElute permitem volumes de eluição de 20 µl ou 60 µl.

Dependendo do ensaio posterior utilizado, o eluato de ácido nucleico pode incluir até 50% do volume de reação sem quaisquer efeitos inibitórios.

Procedimento QIAamp DSP Virus



Equipamento e reagentes a serem fornecidos pelo usuário

Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre utilize um avental de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as nossas fichas de dados de segurança (SDSs) disponíveis com o fornecedor do produto.

- Etanol (96–100%)
- Pipetas* e pontas de pipetas (para evitar a contaminação cruzada, recomendamos a utilização de pontas de pipetas com barreiras para aerossóis)
- Luvas descartáveis
- Bloco de aquecimento* para a lise das amostras a 56 °C (recomendamos o sistema termoaagitador Eppendorf® Thermomixer comfort com bloco térmico para micro tubos de teste de 2,0 ml†)
- Microcentrífuga*
- Cilindro graduado (50 ml)
- Agitador tipo vórtex
- O sistema de vácuo QIAvac 24 Plus‡ (QIAvac 24 Plus, nº de ref.º 19413, QIAvac Connecting System (sistema de ligação QIAvac), nº de ref.º 19419 e Vacuum Pump (bomba de vácuo), nº de ref.º 84020§), ou qualquer sistema de vácuo equivalente para laboratório

* Para garantir que as amostras sejam devidamente processadas no procedimento QIAamp DSP Virus, recomendamos que os instrumentos (por ex., pipetas e blocos de aquecimento) sejam calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.


† Esta não é uma lista completa de fornecedores e não inclui vários vendedores importantes de material biológico.

‡ Disponível desde meados de 2004; consulte www.qiagen.com/products/accessories.

§ O nº de ref.º 84020 refere-se a uma bomba para uso em países da Europa (por exemplo, Alemanha). Para países com outros requisitos de tensão ou plugues, entre em contato com a assistência técnica da QIAGEN.

Notas importantes

Pontos importantes antes de iniciar

- Após o recebimento do kit, verifique se há algum dano nos componentes do kit. Se os blisters ou os recipientes dos tampões estiverem danificados, entre em contato com a Assistência Técnica da QIAGEN ou com o distribuidor local. No caso de derramamento de líquidos, consulte "Avisos e precauções" (página 6).
- Não use componentes de kits danificados, pois seu uso pode prejudicar o desempenho do kit.
- Use sempre equipamentos sem RNase.
- Conserve o etanol (96 a 100%) em gelo durante o procedimento.
- Troque sempre as ponteiros das pipetas entre as transferências de líquidos. Para evitar a contaminação cruzada, recomenda-se o uso de ponteiros de pipetas com barreiras contra aerossóis.
- Todas as etapas de centrifugação são realizadas à temperatura ambiente (15 °C a 25 °C).
- Use sempre 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 evitar a contaminação cruzada, abra apenas um tubo por vez.
- 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 garantir a segurança em relação a materiais potencialmente infecciosos, recomenda-se trabalhar em condições de fluxo de ar laminar até que as amostras sejam lisadas.
- Esse kit sempre deve ser usado por uma equipe treinada em práticas laboratoriais de diagnóstico in vitro.
- 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.

Preparo de RNA

Ao preparar o RNA viral, trabalhe rapidamente durante os passos manuais do procedimento.

O tampão de eluição (AVE) contém azida de sódio*, um agente antimicrobiano que impede o crescimento de organismos produtores de RNase. No entanto, como este tampão não contém quaisquer agentes químicos de degradação da RNase, ele não inibirá ativamente RNases introduzidas por um manuseamento incorreto. É necessário ter extremo cuidado para evitar a contaminação com RNases durante o manuseamento do tampão de eluição (AVE).

Armazenamento de amostras

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 -20 °C a -80 °C. As amostras congeladas de plasma ou soro não devem ser descongeladas mais de uma vez. O congelamento e descongelamento recorrente leva 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.

Preparação de reagentes e tampões

Preparação da protease QIAGEN

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



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

* Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção.

Adição de RNA transportador e controle interno no tampão de lise

O RNA transportador serve para duas finalidades. Primeiro, ele aprimora a ligação dos ácidos nucleicos virais à membrana da coluna QIAamp MinElute, especialmente se houver muito poucas moléculas-alvo na amostra. Segundo, a adição de grandes quantidades de RNA transportador reduz as chances 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 transportador não for acrescentado ao tampão de lise (AL), isso pode levar a uma recuperação reduzida de RNA e DNA virais.

O RNA transportador 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.

Recomenda-se a utilização de um controle interno durante a utilização do kit QIAamp DSP Virus em conjunto com sistemas de amplificação de diagnóstico. O RNA ou o DNA de controle interno e o RNA transportador reconstituído devem ser adicionados ao tampão de lise (AL) e minuciosamente misturados, invertendo o tubo 10 vezes. Para evitar a formação de espuma, não centrifugue.

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 kit QIAamp DSP Virus utiliza um volume de amostra inicial de 500 µl.

Para preparar a solução de RNA transportador, adicione 310 µl de tampão de eluição (AVE) ao tubo que contém 310 µg de RNA transportador liofilizado para obter uma solução de 1 µg/µl. Dissolva completamente o RNA transportador, divida-o em alíquotas no tamanho mais conveniente e armazene-o a -20 °C. Não congele-descongele as alíquotas do RNA transportador mais do que 2 vezes.

Observe que o RNA transportador 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 transportador seja completamente dissolvido no volume correto do tampão de eluição (AVE) antes de o misturar com o tampão de lise (AL).



Use sempre o controle interno correto para o ensaio posterior. Consulte mais informações nas instruções do fabricante.

Calcule o volume da mistura de tampão de lise (AL)/RNA transportador por lote de amostras, selecionando o número de amostras a processar simultaneamente, a partir da Tabela 4. Os volumes são calculados utilizando o seguinte cálculo de amostras:

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

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

onde: n = número de amostras a serem processadas simultaneamente

y = volume calculado de tampão de lise (AL)

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

Tabela 4.- Volumes de tampão de lise (AL) e de RNA transportador/tampão de eluição (AVE) necessários para o procedimento QIAamp DSP Virus

Nº amostras	Vol. AL (ml)	Vol. RNA transportador/AVE (µl)	Nº amostras	Vol. AL (ml)	Vol. RNA transportador/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

Preparação do Tampão de Lavagem 1

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. Armazene o tampão de lavagem 1 (AW1) reconstituído à temperatura ambiente (15 a 25 °C).



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

Preparação do Tampão de Lavagem 2

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. Armazene o tampão de lavagem 2 (AW2) reconstituído à temperatura ambiente (15 a 25 °C).



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

Preparação do tampão de eluição

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 utilizando um único kit, recomendamos o descarte do tubo do tampão de eluição (AVE) no final de cada procedimento.

Eluição de ácidos nucleicos virais

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.

O volume de ácidos nucleicos virais eluídos de uma coluna QIAamp MinElute pode ter até 5 µl a menos do que o volume do tampão de eluição (AVE) aplicado à coluna. Por exemplo, a eluição de ácidos nucleicos virais com 60 µl de tampão de eluição (AVE) resulta em um eluato de aproximadamente 55 µl, ao passo que eluir com 20 µl resulta em, aproximadamente, 15 µl de eluato.

O volume de eluído recuperado depende da natureza da amostra. Se o volume de eluato obtido for muito baixo para o ensaio posterior, aumente o volume adicionando mais tampão de eluição (AVE).

Os ácidos nucleicos virais eluídos são coletados em tubos de eluição (ET). Para conservar os ácidos nucleicos por até 24 horas, recomendamos o armazenamento entre 2 e 8 °C.

Rendimento e qualidade dos ácidos nucleicos virais

O rendimento e qualidade dos ácidos nucleicos virais permitem que sejam utilizados em todos os tipos de procedimentos de detecção posterior em diagnósticos moleculares. Os ensaios de diagnóstico devem ser realizados de acordo com as instruções do fabricante.

Montagem do sistema de vácuo QIAvac 24 Plus

Certifique-se de que o extensor da coluna (EXT), a coluna QIAamp MinElute, o conector de vácuo (VC) e a válvula de vácuo estejam corretamente instalados (consulte a Figura 3).

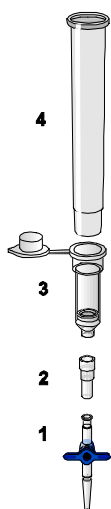


Figura 3. Montagem dos componentes do kit QIAamp DSP Virus para o processamento de amostras com vácuo:

1: Válvula de vácuo (fornecida com o sistema de vácuo)

3: Coluna QIAamp MinElute

2: Conector de vácuo (VC)

4: Extensores da coluna (EXT)

Recomendamos rotular os tubos de lise (LT), os tubos de eluição (ET) e as colunas QIAamp MinElute para utilização com o sistema de vácuo QIAvac 24 Plus de acordo com o esquema na Figura 4 para evitar a mistura de amostras. Essa figura pode ser fotocopiada e rotulada com os nomes das amostras.

Data: _____

Operador: _____

ID da execução: _____

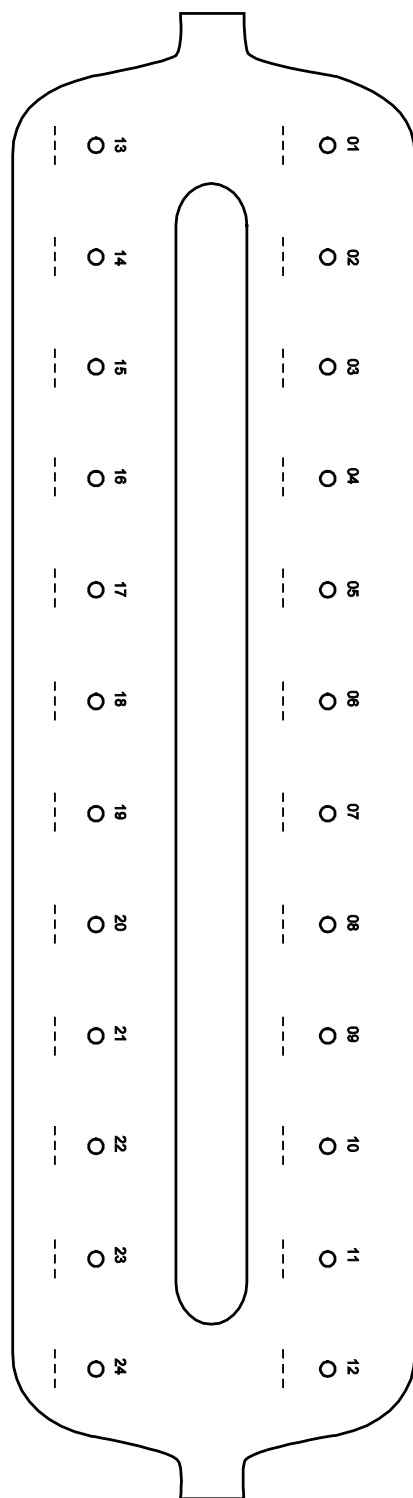


Figura 4. Esquema de identificação dos tubos de lise (LT), dos tubos de eluição (ET) e das colunas QIAamp MinElute para utilização com o sistema de vácuo QIAvac 24 Plus.

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 iniciar

- Equilibre as amostras a temperatura ambiente (15 a 25 °C) e certifique-se de que elas estejam bem misturadas.
- Adicione o RNA transportador reconstituído em tampão de eluição (AVE) ou controle interno ao tampão de lise (AL), de acordo com as instruções na página 17.
- Certifique-se de que o tampão de lavagem 1 (AW1), o tampão de lavagem 2 (AW2) e a protease QIAGEN (QP) tenham sido preparadas de acordo com as instruções contidas nas “Notas importantes”, na página 16.
- Equilibre o tampão de eluição (AVE) a temperatura ambiente (15 a 25 °C) para utilizá-lo no passo 18. Se possível, utilize um tampão de eluição (AVE) novo a cada procedimento (são fornecidos 4 tubos).
- Coloque um bloco de aquecimento a 56 °C, para utilizá-lo nos passos 4 e 17.
- Para evitar a contaminação cruzada, insira um conector de vácuo (VC) em cada adaptador luer do sistema de vácuo.
- Certifique-se de que o frasco de resíduos do sistema de vácuo esteja vazio e 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 protease QIAGEN (QP) em um tubo de lise (LT).



Verifique a data de validade da protease reconstituída antes de utilizá-la.

2. Adicione 500 µl de plasma ou soro ao tubo de lise (LT).

3. Adicione 500 µl de tampão de lise (LT) (contendo 11,2 µg/ml de RNA transportador) ao tubo de lise (LT), feche a tampa e agite com um misturador de vórtice por impulsos 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 ou utilizando uma pipeta apropriada como a pipeta Eppendorf multistep ou equivalente.



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

4. Incube a 56 °C (±1 °C), por 15 min (±1 min).
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 agite com um misturador de vórtice por impulsos por ≥15 segundos. Incube por 5 minutos (±1 min) a temperatura ambiente (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 conector de vácuo (VC) no sistema de vácuo (consulte a figura Figura 3, na página 21). Insira um extensor da coluna (EXT) na coluna QIAamp MinElute aberta.



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



10. Troque de luvas e abra apenas um tubo de cada vez.
11. Aplique cuidadosamente todo o lisado obtido no passo 7 no extensor da coluna (EXT) da coluna QIAamp MinElute, sem molhar a borda. Evite o contato da membrana da coluna QIAamp MinElute com a ponta da pipeta.

12. Ligue a bomba de vácuo. Quando o lisado tiver passado completamente 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 ao mesmo tempo, recomendamos fechar a válvula de vácuo de cada coluna após o lisado ter passado através dela para reduzir a duração deste passo de vácuo.



Se o lisado não tiver passado completamente através da membrana após 15 min, 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. Evite o contato da membrana da coluna QIAamp MinElute com a ponta da pipeta. 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. Evite o contato da membrana da coluna QIAamp MinElute com a ponta da pipeta. 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.



Utilize pontas de pipeta com proteção 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 conector de vácuo (VC). Coloque a coluna QIAamp MinElute no tubo de lavagem (WT) guardado no passo 9 e centrifugue à velocidade máxima (aproximadamente 20.000 x g ou 14.000 rpm) por 1 minuto para secar a membrana completamente. Descarte o tubo de lavagem (WT) que contém o filtrado.



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

17. Coloque a coluna QIAamp MinElute num 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 tubo de eluição (ET) limpo 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. 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.



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

Para obter informações de licenciamento atualizadas e isenções de responsabilidade específicas do produto, consulte o manual do usuário ou o manual de instruções do kit QIAGEN correspondente. Os manuais de instruções dos kits da QIAGEN e os manuais do usuário estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados aos Serviços técnicos da QIAGEN ou ao distribuidor local.

Histórico de revisão

Histórico de revisão do documento	
R4 08/2018	Foi adicionada uma nota de esclarecimento sobre o nº de ref. ^a da bomba de vácuo, consulte a página 15. Atualização do formato do manual.

Contrato de licença limitada para XXXXX [insira o nome do produto]

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

1. O produto pode ser usado somente de acordo com os protocolos fornecidos com o produto e esse manual e para uso com componentes contidos apenas no kit. A QIAGEN não concede qualquer licença sob sua propriedade intelectual para o uso ou incorporação dos componentes incluídos neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, exceto conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, este manual e 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 infringem os direitos de terceiros.
2. Com exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este kit e/ou a sua(s) utilização(ões) não infrinja os direitos de terceiros.
3. Esse kit e seus componentes são licenciados para uso único e podem não ser reutilizáveis, reconstruídos nem revendidos.
4. A QIAGEN especificamente renuncia a quaisquer outras licenças, indicadas ou embutidas, a não ser àquelas expressamente indicadas.
5. O comprador e o usuário do kit concordam em não realizar nenhuma etapa, nem permitir que outra pessoa assim o faça, que possa levar ou facilitar quaisquer atos proibidos conforme descrito acima. A QIAGEN poderá executar as proibições desse Acordo de licença limitado em qualquer Tribunal. Também deverá recuperar todos os custos da investigação e relativos ao Tribunal, incluindo os encargos dos advogados, em qualquer ação para executar o Acordo de licença limitado ou quaisquer direitos de propriedade intelectual relacionados ao kit e/ou seus componentes.

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

Marcas registradas: QIAGEN®, QIAamp®, artus®, MinElute® (QIAGEN Group); AMPLICOR HBV MONITOR®, AMPLICOR HCV MONITOR®, AMPLICOR HIV-1 MONITOR®, cobas®, TaqMan® (Roche Group); RealArt™ (artus GmbH); Eppendorf® (Eppendorf AG). Os nomes registrados, marcas registradas, etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcados especificamente como tais, não devem ser considerados como não protegidos pela lei.

O processo de PCR está coberto pelas Patentes EUA 4.683.195 e 4.683.202 e equivalentes estrangeiros pertencentes à Hoffmann-La Roche AG.

1114514 08/2018 HB-0109-003 © 2018 QIAGEN, todos os direitos reservados.

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