

Janeiro de 2021

Instruções de uso (Manual) do QIAamp[®] DSP Viral RNA Mini Kit



Versão 1



Para uso em diagnóstico in vitro



61904



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden
Tel.: +49-2103-29-0



1122786BR



Conteúdo

Uso previsto	5
Descrição e princípio	6
Adsorção para a membrana QIAamp	8
Remoção de contaminantes residuais.....	8
Eluição com Buffer AVE.....	8
Contaminação com DNA celular.....	9
Volumes das amostras.....	9
Lise.....	9
RNA carreador	10
Adição de controlos internos.....	10
Procedimentos de centrifugação e a vácuo.....	11
Purificação de RNA viral automatizada no QIAcube/QIAcube Connect MDx	11
Resumo e explicação	13
Materiais fornecidos	14
Conteúdo do kit	14
Materiais necessários, mas não fornecidos	15
Avisos e precauções	17
Informações de segurança.....	17
Armazenamento e manuseio de reagentes	20
Armazenamento e manuseio de espécimes.....	20
Procedimento	21
Pontos importantes antes de começar	21

Preparo de reagentes e tampões	23
Manuseio das colunas de centrifugação QIAamp Mini	26
Configuração do coletor de vácuo QIAvac 24 Plus	29
Centrifugação	30
Protocolo: Concentração da amostra	31
Protocolo: Purificação de RNA viral usando uma microcentrífuga ou o QIAcube/QIAcube Connect MDx	32
Protocolo: Purificação do RNA viral (protocolo de vácuo)	35
Controle de qualidade	39
Limitações	39
Símbolos	40
Informações de contato	42
Apêndice	43
Informações para pedidos	47
Histórico de revisões do documento	49

Uso previsto

- QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit é um sistema que usa tecnologia de membrana de sílica (tecnologia QIAamp) para o isolamento e a purificação de RNA viral de amostras biológicas.
- produto deve ser usado por usuários profissionais, como técnicos e médicos, que são treinados em técnicas biológicas moleculares.
- QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit deve ser usado para diagnóstico in vitro.

Descrição e princípio

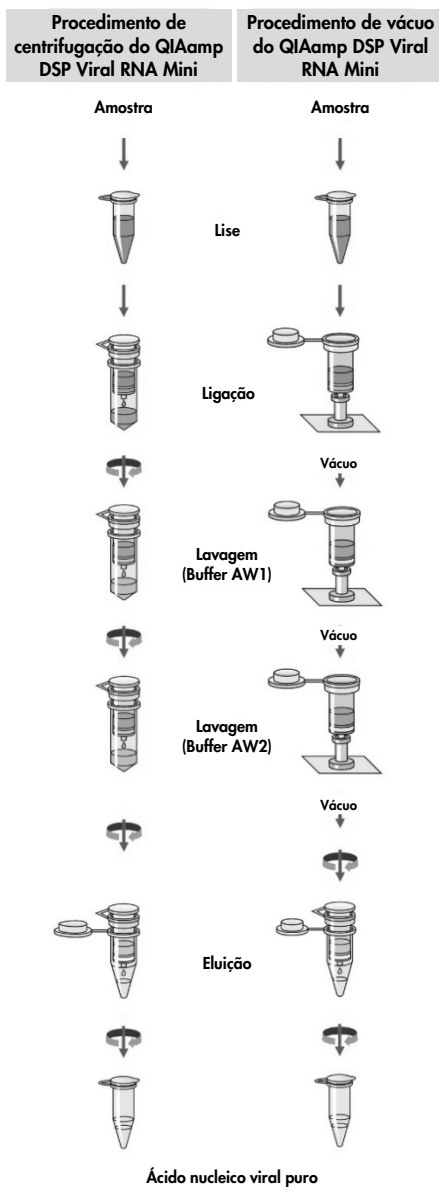
O QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit representa uma tecnologia consagrada de preparo do RNA viral. O kit combina as propriedades de ligação seletivas de uma membrana à base de sílica-gel com a velocidade da tecnologia de centrifugação ou de vácuo e é recomendado para o processamento simultâneo de várias amostras. Os protocolos de centrifugação do QIAamp DSP Viral RNA podem ser automatizados no QIAcube® e no QIAcube Connect MDx.

Primeiro, a amostra é lisada sob condições altamente desnaturantes para inativar as RNases e garantir o isolamento do RNA viral intacto. As condições de tamponamento são então ajustadas para oferecer uma ótima ligação do RNA à membrana QIAamp, e a amostra é carregada na coluna de centrifugação QIAamp Mini. O RNA se liga à membrana, e os contaminantes são arrastados com eficiência em duas etapas, com o uso de dois tampões de lavagem diferentes. O RNA de alta qualidade é eluído em um tampão especial sem RNase, pronto para o uso direto ou o armazenamento seguro.

A membrana QIAamp especial oferece alta recuperação de RNA puro e intacto em apenas 20 minutos, sem o uso de extração por fenol/clorofórmio ou precipitação com álcool.

Todos os tampões e reagentes são comprovadamente livres de RNase.

Automatizável no QIAcube/QIAcube Connect MDx



Adsorção para a membrana QIAamp

As condições de tamponamento do lisado devem ser ajustadas para oferecer condições ótimas de ligação para o RNA viral antes do carregamento da amostra na coluna de centrifugação QIAamp Mini. Dado o grande volume de lisado, será necessário carregá-lo na coluna de centrifugação QIAamp Mini em várias etapas. O RNA viral é adsorvido na membrana de sílica QIAamp durante duas etapas rápidas de centrifugação ou a vácuo. Os níveis de sal e de pH no lisado garantem que as proteínas e outros contaminantes, que podem inibir as reações enzimáticas a jusante, não sejam retidos na membrana QIAamp.

Remoção de contaminantes residuais

O RNA viral, ligado à membrana QIAamp, é separado dos contaminantes durante duas etapas rápidas de centrifugação ou vácuo. O uso de dois tampões de lavagem diferentes, AW1 e AW2, melhora consideravelmente a pureza do RNA eluído. As condições de lavagem otimizadas garantem a remoção eficiente de qualquer contaminante residual sem afetar a ligação do RNA.

Eluição com Buffer AVE

O Buffer AVE é composto de água sem RNase com 0,04% de azida de sódio para evitar a proliferação microbiana e a contaminação posterior com RNases. A azida de sódio afeta as leituras espectrofotométricas de absorbância entre 220 e 280 nm, mas não interfere nas aplicações a jusante, como a RT-PCR. Caso seja necessário determinar a pureza do RNA eluído, recomendamos a calibração do espectrofotômetro com Buffer AVE antes de medir a absorbância.

Contaminação com DNA celular

O QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit não foi projetado para separar o RNA viral do DNA celular, e ambos serão purificados em paralelo se estiverem presentes na amostra. Para evitar a copurificação do DNA celular, recomenda-se o uso de fluidos corporais sem células para o preparo do RNA viral. As amostras com células, como o líquido cerebrospinal, a medula óssea, a urina e a maioria dos esfregaços, devem primeiro ser filtradas ou centrifugadas durante 10 minutos, a aproximadamente 1500 x g, e o sobrenadante deve ser usado. Se o RNA e o DNA tiverem sido isolados paralelamente, o eluato pode ser digerido com DNase, com o uso de DNase sem RNase, e, em seguida, submetido a tratamento térmico (15 minutos \pm 1 minuto, 70 °C \pm 3 °C) para inativar a DNase.

Volumes das amostras

O procedimento com o QIAamp DSP Viral RNA é otimizado para o uso com amostras de 140 μ l. Amostras pequenas devem ser ajustadas até o volume de 140 μ l com tampão fosfato-salino (phosphate-buffered saline, PBS) antes do carregamento, e a concentração de amostras com título viral baixo deve ser ajustada para 140 μ l antes do processamento. Consulte "Protocolo: Concentração da amostra", página 31.

Lise

Primeiro, a amostra é lisada sob as condições altamente desnaturantes fornecidas pelo Buffer AVL para inativar as RNases e garantir o isolamento do RNA viral intacto. O RNA carreador, adicionado ao Buffer AVL, melhora a ligação do RNA viral à membrana QIAamp, sobretudo no caso de amostras de baixo título, e limita a possível degradação do RNA viral devido a alguma atividade de RNase residual.

RNA carreador

O RNA carreador serve para duas finalidades. Primeiro, ele aprimora a ligação dos ácidos nucleicos virais à membrana da coluna de centrifugação QIAamp Mini, especialmente se houver muito poucas moléculas-alvo na amostra. Em segundo lugar, a adição de grandes quantidades de RNA carreador reduz a chance de degradação do RNA viral no caso raro de moléculas de RNase escaparem da desnaturação por sais caotrópicos e detergente no Buffer AVL. Se o RNA carreador não for adicionado ao Buffer AVL, isso pode reduzir a recuperação de RNA viral.

A quantidade de RNA carreador liofilizado fornecida é suficiente para o volume de Buffer AVL fornecido com o kit. A concentração do RNA carreador foi ajustada para que o QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit possa ser usado como um sistema de purificação genérico compatível com muitos sistemas de amplificação diferentes e para que seja adequado para uma ampla gama de vírus RNA.

Diferentes sistemas de amplificação variam em eficiência, dependendo da quantidade total de ácido nucleico presente na reação. Os eluatos deste kit contêm ácidos nucleicos virais e RNA carreador, e as quantidades de RNA carreador excederão, e muito, as quantidades de ácidos nucleicos virais. Portanto, os cálculos de quanto eluato adicionar a amplificações a jusante deverão ser baseados na quantidade de RNA carreador adicionado. Para obter os níveis mais elevados de sensibilidade em reações de amplificação, pode ser necessário ajustar a quantidade de RNA carreador adicionado ao Buffer AVL.

Adição de controles internos

Ao usar os protocolos do QIAamp DSP Viral RNA Mini em combinação com os sistemas de amplificação disponíveis no mercado, é altamente recomendável a introdução de um controle interno no procedimento de purificação para garantir resultados de teste confiáveis. O RNA ou DNA de controle interno deve ser adicionado junto com o RNA carreador ao tampão de lise. Para obter uma ótima eficiência na purificação, as moléculas de controle interno devem ter mais de 200 nucleotídeos, pois as moléculas menores não são recuperadas com eficiência.

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

Procedimentos de centrifugação e a vácuo

O procedimento de purificação do QIAamp DSP Viral RNA Mini é realizado em três etapas, com o uso das colunas de centrifugação QIAamp Mini em uma microcentrífuga padrão, em um coletor de vácuo ou no QIAcube. Os procedimentos destinam-se a garantir que não haja contaminação cruzada de uma amostra a outra e a permitir a manipulação segura de amostras potencialmente infecciosas.

As colunas de centrifugação QIAamp Mini cabem na maioria dos tubos da microcentrífuga padrão. No protocolo de centrifugação, dado o volume de filtrado, são necessários tubos de lavagem (WT) de 2 ml (fornecidos) para sustentar a coluna de centrifugação QIAamp Mini durante as etapas de carregamento e lavagem. Para o protocolo de vácuo, são necessários um coletor de vácuo (QIAvac 24 Plus ou equivalente; consulte a página 15) e uma bomba de vácuo capaz de produzir um vácuo de -800 a -900 mbar (por ex., a QIAGEN® Vacuum Pump).

O RNA eluído pode ser coletado em tubos da microcentrífuga padrão de 1,5 ml (fornecidos). Esses tubos não devem conter RNase, para evitar a degradação do RNA viral por RNases.

Purificação de RNA viral automatizada no QIAcube/QIAcube Connect MDx

O QIAcube e o QIAcube Connect MDx realizam o isolamento e a purificação automatizados de ácidos nucleicos. Eles podem processar até 12 amostras em cada execução.

Com a automatização do QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit no QIAcube ou no QIAcube Connect MDx, o instrumento pode processar menos de 50 amostras devido aos volumes mortos, à evaporação e ao consumo adicional de reagentes pela pipetagem automatizada. A QIAGEN garante apenas 50 preparos de amostra com o uso manual do QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit.



Figura 1. O QIAcube.

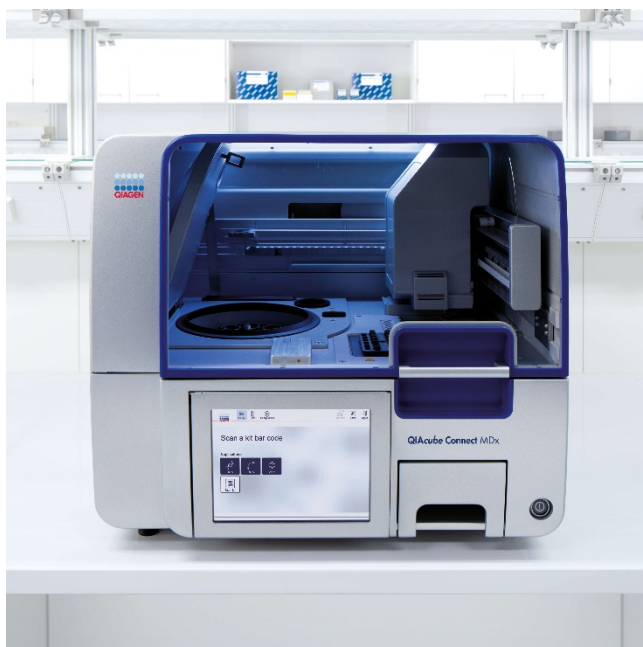



Figura 2. O QIAcube Connect MDx.

Resumo e explicação

O QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit fornece o método para a purificação de RNA viral para o uso seguro em tecnologias de amplificação. O RNA viral pode ser purificado a partir do plasma (tratado com anticoagulantes que não sejam a heparina), soro e outros fluidos corporais sem células.

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit			(50)
Nº de referência			61904
Número de preparos			50†
QIAamp Mini Spin	QIAamp Mini Spin Columns with Wash Tubes (QIAamp Mini Spin Columns com tubos de lavagem)	COL	50
ET	Elution Tubes (Tubos de eluição) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (Tubos de lise) (2 ml)	LYS TUBE	50
WT	Wash Tubes (Tubos de lavagem) (2 ml)	WASH TUBE	4 x 50
AVL	Buffer AVL*	VIR LYS BUF	31 ml
AW1	Buffer AW1* (concentrado)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
AW2	Buffer AW2† (concentrado)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
AVE	Buffer AVE†	ELU BUF	3 x 2 ml
Carrier	Carrier RNA (RNA carreador) (poli A)	CAR RNA	310 µg
–	Instruções de uso (Manual)		1

* Contém sal caotrópico. Não compatível com desinfetantes que contenham água sanitária. Consulte a página 17 sobre avisos e precauções.

† Contém azida de sódio como conservante.

‡ Com a automatização do QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit no instrumento QIAcube ou no QIAcube Connect MDx, o instrumento pode processar menos de 50 amostras devido aos volumes mortos, à evaporação e ao consumo adicional de reagentes pela pipetagem automatizada. A QIAGEN garante apenas 50 preparos de amostra com o uso manual do QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit.

Materiais necessários, mas não fornecidos

Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

- Etanol (96 a 100%) *
- Tubos da microcentrífuga de 1,5 ml
- Pipetas estéreis, sem RNase[†]
- Ponteiros de pipetas estéreis e sem RNase (para evitar a contaminação cruzada, é recomendável o uso de ponteiros de pipeta com barreira contra aerossóis)
- Microcentrífuga[†] (com rotor para tubos de 1,5 ml e 2 ml)

Para protocolos de vácuo

- Coletor de vácuo QIAvac 24 Plus (n° de ref. 19413) ou equivalente
- VacConnectors (n° de ref. 19407)
- Vacuum Regulator (n° de ref. 19530) para facilitar o monitoramento das pressões de vácuo e a liberação do vácuo
- Vacuum Pump (n° de ref. 84010, ou bomba equivalente capaz de produzir um vácuo de -800 a -900 mbar)
- Opcional: VacValves (n° de ref. 19408)
- Opcional: QIAvac Connecting System (n° de ref. 19419)

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

[†] Para garantir que as amostras sejam processadas corretamente nos procedimentos do QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit, é altamente recomendável que os instrumentos (por ex., microcentrífugas) sejam calibrados de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Apenas para o procedimento automatizado

- Rotor Adapters, n° de ref. 990394
- Rotor Adapter Holder, n° de ref. 990392
- Sample Tubes CB (2 ml), n° de ref. 990382 (tubo de inserção de amostra)
- Shaker Rack Plugs, n° de ref. 9017854
- Reagent Bottles, 30 ml, n° de ref. 990393
- Filter-Tips, 1000 µl, n° de ref. 990352

Avisos e precauções

Esteja ciente de que poderá ser necessário relatar incidentes graves que tenham ocorrido em relação ao dispositivo ao fabricante e à autoridade regulatória na qual o usuário e/ou o paciente estão estabelecidos.

Informações de segurança

Para uso em diagnóstico in vitro

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

O RNA é extremamente sensível às RNases e sempre deve ser preparado com o devido cuidado. Partículas das mãos e de pó podem carregar bactérias e mofo e são as fontes mais comuns de contaminação por RNase. Leia "Manuseio de RNA" no Apêndice (página 43) deste manual, antes de começar.

A reação de cadeia de polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) sempre deve ser realizada de acordo com as boas práticas laboratoriais. Nesse sentido, um laboratório de PCR sempre deve ser dividido em três áreas: uma para o preparo de reagentes, uma para o preparo de amostras, e uma para a amplificação e a detecção. Dada a alta sensibilidade da PCR, é absolutamente necessário que todos os reagentes permaneçam puros e incontaminados e que sejam monitorados de maneira cuidadosa e rotineira. Reagentes contaminados devem ser descartados.



CUIDADO: NÃO adicione água sanitária ou soluções ácidas diretamente no Buffer AVL ou no Buffer AW1.

Os Buffers AVL e AW1 contêm sais de guanidina, que podem formar compostos altamente reativos quando combinados 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 frascos dos tampões 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 o resíduo líquido gerado pelos procedimentos do QIAamp DSP Viral RNA Mini em relação a materiais residuais infecciosos. 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 advertências e recomendações de precaução a seguir aplicam-se aos componentes do QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit:

Buffer AVL



Contém: tiocianato de guanidina. Perigo! Nocivo se em contato com a pele ou inalado. Pode ser nocivo se ingerido. Causa queimaduras graves na pele e lesões oculares. Nocivo para a vida aquática, com efeitos duradouros. Em contato com ácidos, libera gases muito tóxicos. Elimine o conteúdo/recipiente em um local de eliminação de resíduos aprovado. EM CASO DE CONTATO COM OS OLHOS: Enxágue cuidadosamente com água por vários minutos. Remova lentes de contato, se presentes e fáceis de remover. Continue enxaguando. Retire a roupa contaminada e lave-a, antes de usá-la novamente. EM CASO DE CONTATO COM A PELE (ou cabelo): Remova/retire imediatamente toda a roupa contaminada. Lave a área afetada da pele com água/no chuveiro. Ligue imediatamente para um CENTRO DE ENVENENAMENTO ou um médico. Armazene em local trancado. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Buffer AW1



Contém: cloridrato de guanidina. Aviso! Nocivo, se engolido ou inalado. Provoca 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.

Armazenamento e manuseio de reagentes

As colunas de centrifugação QIAamp Mini devem ser guardadas secas, entre 2 a 8 °C; o armazenamento a temperaturas mais altas deve ser evitado. Todas as soluções devem ser guardadas à temperatura ambiente (15 a 25 °C), salvo indicação em contrário. As colunas de centrifugação QIAamp Mini e todos os tampões e reagentes podem ser armazenados nessas condições, até a data de validade informada na caixa do kit, sem mostrar nenhuma redução no desempenho.

O RNA carreador liofilizado pode ser armazenado à temperatura ambiente até a data de validade na caixa do kit. O RNA carreador deve ser dissolvido em Buffer AVE. No procedimento manual, o RNA carreador dissolvido deve ser adicionado imediatamente ao Buffer AVL, conforme descrito na página 23. Essa solução deve ser preparada fresca, mantendo-se estável entre 2 e 8 °C por até 48 horas. Quando armazenado entre 2 e 8 °C, o Buffer AVL–RNA carreador desenvolve um precipitado que deve ser dissolvido novamente por meio de aquecimento a 80 °C ± 3 °C antes do uso. As porções não utilizadas de RNA carreador dissolvido no Buffer AVE devem ser congeladas em alíquotas entre -30 e -15 °C. Não congele–descongele as alíquotas do RNA carreador mais de 3 vezes.

NÃO aqueça a solução de Buffer AVL–RNA carreador mais de 6 vezes. NÃO incube a 80 °C durante mais de 5 minutos. O aquecimento frequente e a incubação prolongada causarão a degradação do RNA carreador, reduzindo a recuperação de RNA viral e levando, por fim, a resultados de RT-PCR falso-negativos, principalmente quando são usadas amostras de baixo título.

Armazenamento e manuseio de espécimes

Após a coleta e a centrifugação, o plasma (tratado ou não com anticoagulantes que não sejam a heparina) ou o soro podem ser armazenados a 2 a 8 °C por até 6 horas. Para o armazenamento prolongado, recomenda-se o congelamento em alíquotas entre -80 e -20 °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, reduzindo os títulos virais e, conseqüentemente, as produções do RNA viral isolado. Além disso, os crioprecipitados formados pelo congelamento–descongelamento causarão a obstrução da membrana QIAamp. Se os crioprecipitados estiverem visíveis, eles poderão ser peletizados por meio de uma breve centrifugação, a aproximadamente 6800 x g durante 3 minutos ± 30 segundos. O sobrenadante liberado deve ser removido, sem perturbar o pellet, e processado imediatamente.

Procedimento

Pontos importantes antes de começar

- Assim que receber o kit, verifique se há algum dano nos respectivos componentes. Se os blísteres ou os recipientes dos tampões estiverem danificados, entre em contato com a Assistência Técnica da QIAGEN ou com o distribuidor local. Em caso de derramamento de líquidos, consulte "Avisos e precauções" (página 17). Não use componentes de kits danificados, uma vez que o seu uso pode prejudicar o desempenho do kit.
- Use sempre equipamentos sem RNase.
- Troque sempre as ponteiros das pipetas entre as transferências de líquidos. Para minimizar a contaminação cruzada, recomenda-se o uso de ponteiros de pipeta com barreira contra aerossóis.
- Todas as etapas de centrifugação são realizadas à temperatura ambiente (15–25 °C).
- Use sempre luvas descartáveis e verifique regularmente se elas não estão contaminadas com o material da amostra. Descarte as luvas se elas se contaminarem.
- Para minimizar a contaminação cruzada, abra apenas um tubo por vez.
- Não use componentes de outros kits com os kits que estiver usando no momento, a menos que os números de lote sejam idênticos.
- Evite a contaminação microbiana dos reagentes do kit.

-
- Para aumentar a segurança em relação a materiais potencialmente infecciosos, recomenda-se trabalhar em condições de fluxo de ar laminar até que as amostras sejam lisadas.
 - Para automação, siga as instruções nas fichas de protocolo (QIAcube) ou na tela do software (QIAcube Connect MDx) e consulte os manuais do usuário adequados (para o QIAcube e o QIAcube Connect MDx).
 - Esse kit apenas deve ser usado por uma equipe treinada em práticas laboratoriais de diagnóstico in vitro.

Notas importantes

Dedique alguns momentos para ler este manual com cuidado antes de começar o preparo. Os comentários nos protocolos do QIAamp DSP Viral RNA Mini, a partir da página 31, são particularmente valiosos.

Se estiver preparando o RNA pela primeira vez, leia "Manuseio de RNA" no Apêndice deste manual (página 43). Todas as etapas dos protocolos do QIAamp DSP Viral RNA Mini devem ser executadas com rapidez e à temperatura ambiente. O procedimento do QIAamp DSP Viral RNA Mini não foi projetado para separar o RNA do DNA. Para evitar a contaminação com DNA celular, siga as orientações em "Contaminação com DNA celular" na página 9 deste manual. O procedimento do QIAamp DSP Viral RNA Mini isola todas as moléculas de RNA com mais de 200 nucleotídeos. As moléculas menores de RNA não se ligarão quantitativamente nas condições de uso.

Preparo de reagentes e tampões

- Adição de RNA carreador ao Buffer AVL* (apenas para o procedimento manual)
Adicione 310 µl de Buffer AVE ao tubo que contém 310 µg de RNA carreador liofilizado para obter uma solução de 1 µg/µl. Dissolva completamente o RNA carreador, divida-o em alíquotas no tamanho mais conveniente e armazene-o entre -25 e -15 °C. Não congele–descongele as alíquotas do RNA carreador mais de 3 vezes.
- Verifique se há precipitado no Buffer AVL e, se necessário, incube-o a 80 °C ± 3 °C até que o precipitado se dissolva. Calcule o volume da mistura de Buffer AVL–RNA carreador necessário por lote de amostras selecionando o número de amostras que serão processadas simultaneamente a partir da Tabela 1 (página 24).

Para números maiores de amostras, os volumes podem ser calculados com o uso do seguinte cálculo amostral:

$$n \times 0,56 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 10 \text{ µl/ml} = z$$

onde: n = número de amostras a serem processadas simultaneamente

y = volume calculado do Buffer AVL

z = volume de RNA carreador–Buffer AVE a ser adicionado ao Buffer AVL

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

Nota: O procedimento de preparo de amostras é otimizado para 5,6 µg de RNA carreador por amostra. Se for demonstrado que menos RNA carreador é melhor para o seu sistema de amplificação, transfira apenas a quantidade necessária de RNA carreador dissolvido para os tubos que contêm Buffer AVL. (O uso de menos de 5,6 µg de RNA carreador por amostra deve ser validado para cada tipo específico de amostra e ensaio posterior.)

* Contém sal caotrópico. Tome as medidas apropriadas de segurança em laboratório e use luvas durante o manuseio. Não compatível com agentes desinfetantes que contenham água sanitária. Consulte a página 17 para obter informações de segurança.

A solução de Buffer AVL-RNA carreador deve ser preparada fresca, mantendo-se estável entre 2 °C e 8 °C por até 48 horas. Quando armazenada entre 2 e 8 °C, a solução desenvolve um precipitado que deve ser dissolvido novamente por meio de aquecimento a 80 °C ± 3 °C antes do uso. Não aqueça a solução de Buffer AVL-RNA carreador mais de 6 vezes. Não incube a 80 °C ± 3 °C durante mais de 5 minutos. O aquecimento frequente e a incubação prolongada causarão a degradação do RNA carreador, reduzindo a recuperação de RNA viral e levando, por fim, a resultados de RT-PCR falso-negativos. Isso acontece principalmente com amostras de baixo título.

Para o procedimento automatizado, o QIAcube/QIAcube Connect MDx realizará a preparação da mistura de Buffer AVL-RNA carreador.

Tabela 1. Volumes (Vol.) de Buffer AVL e da mistura de RNA carreador-Buffer AVE necessários para números específicos (Nº) de amostras para o procedimento do QIAamp DSP Viral RNA Mini

Nº amostras	Vol. Buffer AVL (ml)	Vol. RNA carreador-AVE (µl)	Nº amostras	Vol. Buffer AVL (ml)	Vol. RNA carreador-AVE (µl)
1	0,56	5,6	13	7,28	72,8
2	1,12	11,2	14	7,84	78,4
3	1,68	16,8	15	8,40	84,0
4	2,24	22,4	16	8,96	89,6
5	2,80	28,0	17	9,52	95,2
6	3,36	33,6	18	10,08	100,8
7	3,92	39,2	19	10,64	106,4
8	4,48	44,8	20	11,20	112,0
9	5,04	50,4	21	11,76	117,6
10	5,60	56,0	22	12,32	123,2
11	6,16	61,6	23	12,88	128,8
12	6,72	67,2	24	13,44	134,4

Buffer AW1 *

- Buffer AW1 é fornecido como um concentrado. Antes de usá-lo pela primeira vez, adicione a quantidade adequada de etanol (96 a 100%), conforme indicado no frasco e na Tabela 2.
- Buffer AW1 permanece estável durante 6 meses quando armazenado fechado à temperatura ambiente, mas somente até a data de validade do kit.

Tabela 2. Preparo do Buffer AW1

Nº de ref. do kit	Nº prep.	Concentração de AW1	Etanol	Volume final
61904	50	19 ml	25 ml	44 ml

Buffer AW2†

- Buffer AW2 é fornecido como um concentrado. Antes de usá-lo pela primeira vez, adicione a quantidade adequada de etanol (96 a 100%) ao concentrado de Buffer AW2, conforme indicado no frasco e na Tabela 3.
- Buffer AW2 permanece estável durante 6 meses quando armazenado fechado à temperatura ambiente, mas somente até a data de validade do kit.

Tabela 3. Preparo do Buffer AW2

Nº de ref. do kit	Nº prep.	Concentração de AW2	Etanol	Volume final
61904	50	13 ml	30 ml	43 ml

* Contém sal caotrópico. Tome as medidas apropriadas de segurança em laboratório e use luvas durante o manuseio. Não compatível com agentes desinfetantes que contenham água sanitária. Consulte a página 17 para obter informações de segurança.

† Contém azida de sódio como conservante.

Manuseio das colunas de centrifugação QIAamp Mini

Dada a sensibilidade das tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos, as precauções a seguir são necessárias ao manusear as colunas de centrifugação QIAamp Mini para evitar a contaminação cruzada entre os preparos de amostras:

- Aplique com cuidado a amostra ou solução na coluna de centrifugação QIAamp Mini. Pipete a amostra na coluna de centrifugação QIAamp Mini sem molhar a borda da coluna.
- Troque sempre as ponteiros das pipetas entre as transferências de líquidos. Recomenda-se o uso de ponteiros de pipeta com barreira contra aerossóis.
- Evite o contato da membrana da coluna de centrifugação QIAamp Mini com a ponteira da pipeta.
- Após todas as etapas de agitação em vórtex pulsador, centrifugue brevemente os tubos da microcentrífuga para remover as gotas de dentro das tampas.
- Abra apenas uma coluna de centrifugação QIAamp Mini de cada vez e tome cuidado para evitar a geração de aerossóis.
- Use luvas durante todo o procedimento. Em caso de contato entre as luvas e a amostra, troque as luvas imediatamente.

Protocolo de vácuo no QIAvac

O QIAvac 24 Plus foi criado para processamento a vácuo rápido e eficiente de até 24 coluna de centrifugação QIAGEN em paralelo. As amostras e soluções de lavagem são retiradas pelas membranas da coluna por vácuo, em vez de centrifugação, proporcionando uma maior velocidade e menos tempo de manipulação em procedimentos de purificação.

Em combinação com o QIAvac Connecting System (opcional), o QIAvac 24 Plus pode ser usado como sistema de passagem. A passagem da amostra é coletada em um frasco de resíduos separado.

Para manutenção do QIAvac 24 Plus, consulte as diretrizes de manuseio no *Manual do QIAvac 24 Plus*.

Diretrizes do QIAvac 24 Plus

- Sempre coloque o QIAvac 24 Plus em uma bancada ou área de trabalho segura. Em caso de queda, o coletor QIAvac 24 Plus pode rachar.
- Guarde sempre o QIAvac 24 Plus limpo e seco. Para os procedimentos de limpeza consulte o *Manual do QIAvac 24 Plus*.
- Os componentes do QIAvac 24 Plus não são resistentes a certos solventes (Tabela 4). Se esses solventes forem derramados na unidade, lave completamente com água.
- Para garantir desempenho consistente, não aplique silicone ou graxa a vácuo em nenhuma peça do coletor QIAvac 24 Plus.
- Tenha sempre cuidado e use óculos de segurança ao trabalhar próximo a um coletor a vácuo sob pressão.
- Entre em contato com a Assistência técnica da QIAGEN ou com o distribuidor local, para obter informações com relação a peças sobressalentes ou de reposição.
- A pressão do vácuo é o diferencial de pressão entre a parte interna do coletor de vácuo e a atmosfera (pressão atmosférica padrão de 1013 milibares ou 760 mm Hg) e pode ser medida usando o QIAvac Connecting System ou um regulador de vácuo (consulte a Figura 3, página 28). O protocolo de vácuo requer uma bomba de vácuo capaz de produzir um vácuo de -800 a -900 mbar (por ex., QIAGEN Vacuum Pump). Pressões de vácuo maiores devem ser evitadas. O uso de pressões de vácuo menores que o recomendado pode reduzir o rendimento do DNA e a pureza e aumentar a frequência de entupimento de membranas.

Tabela 4. Propriedades de resistência química do QIAvac 24 Plus

Resistente a:		Não resistente a:
Ácido acético	Sais caotrópicos	Benzeno
Ácido crômico	Álcoois concentrados	Fenol
SDS	Cloreto de sódio	Clorofórmio
Tween® 20	Ureia	Tolueno
Água sanitária	Ácido clorídrico	Éteres
Hidróxido de sódio		

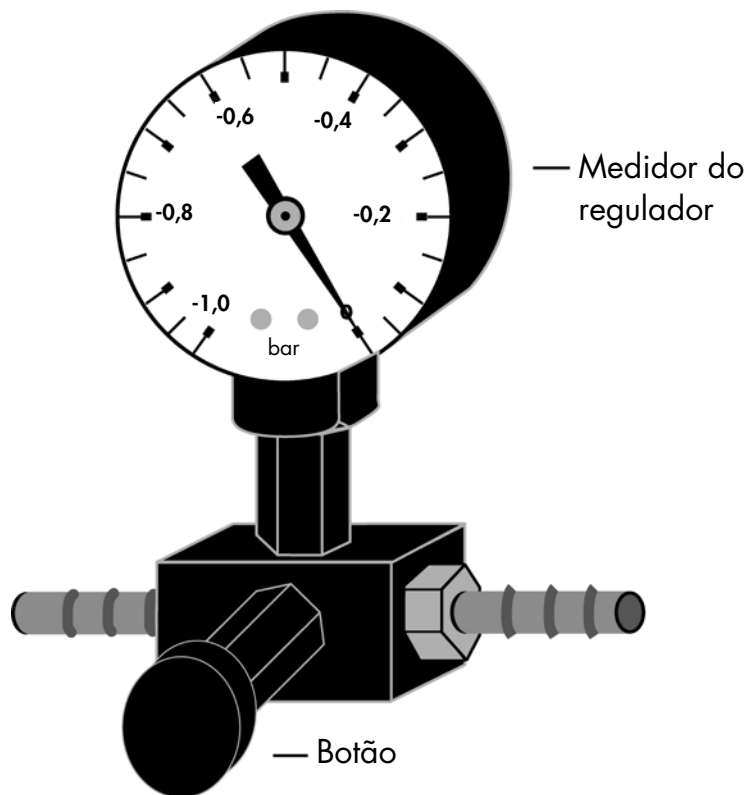


Figura 3. Diagrama esquemático do Vacuum Regulator.

Configuração do coletor de vácuo QIAvac 24 Plus

1. Conecte o QIAvac 24 Plus a uma fonte de vácuo. Se estiver usando o QIAvac Connecting System, conecte o sistema ao coletor e à fonte de vácuo, conforme descrito no Apêndice A do *Manual do QIAvac 24 Plus*.
2. Recomendado: Insira uma VacValve em cada slot luer do QIAvac 24 Plus que será usado (consulte a Figura 4, página 30).
As VacValves devem ser usadas se as taxas de fluxo das amostras diferirem significativamente, para garantir um vácuo consistente.
3. Insira um VacConnector em cada VacValve (consulte a Figura 4) ou diretamente em cada slot luer do QIAvac 24 Plus que será usado. Feche os slots luer não usados com plugues luer ou feche a VacValve inserida.
Execute essa etapa diretamente antes de iniciar a purificação, para evitar a exposição de VacConnectors a possíveis contaminantes presentes no ar.
4. Coloque as colunas de centrifugação QIAamp Mini nos VacConnectors do coletor (consulte a Figura 4).
5. Para purificação de ácidos nucleicos, siga as instruções no protocolo de vácuo. Descarte os VacConnectors corretamente, depois do uso.
Deixe a tampa da coluna de centrifugação QIAamp Mini aberta enquanto aplica o vácuo. Desligue o vácuo entre as etapas, para garantir que um vácuo consistente e constante seja aplicado durante o processamento. Para uma liberação de vácuo mais rápida, um regulador de vácuo deve ser usado (consulte a Figura 3, página 28).

Nota: Cada VacValve pode ser fechada individualmente quando a amostra tiver sido completamente retirada pela coluna de centrifugação, permitindo o processamento paralelo de amostras de diferentes volumes ou viscosidades.

6. Depois do processamento de amostras, limpe o QIAvac 24 Plus (consulte "Limpeza e descontaminação do QIAvac 24 Plus" no *Manual do QIAvac 24 Plus*).

Nota: Os Buffers AVL e AW1 usados no procedimento do QIAamp DSP Viral RNA Mini não são compatíveis com agentes desinfetantes que contenham água sanitária. Consulte a página 17 para obter informações de segurança.

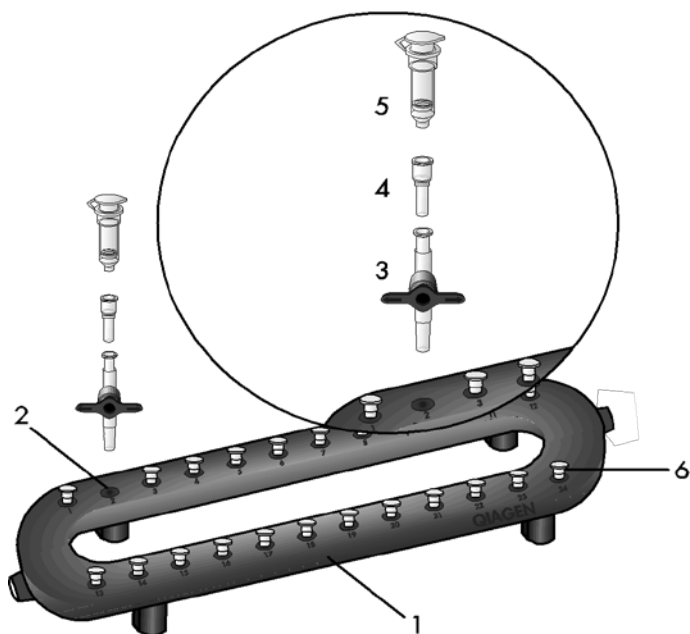


Figura 4. Configuração do QIAvac 24 Plus com as colunas de centrifugação QIAamp Mini usando VacValves e VacConnectors.

- | | |
|------------------------------------|--|
| 1. Coletor de vácuo QIAvac 24 Plus | 4. VacConnector* |
| 2. Slot luer do QIAvac 24 Plus | 5. Coluna de centrifugação QIAamp Mini |
| 3. VacValve (opcional)* | 6. Slot luer fechado com plugue luer |

* Deve ser adquirida separadamente.

Centrifugação

A centrifugação das colunas de centrifugação QIAamp Mini é realizada a aproximadamente 6000 x g para reduzir o ruído da centrífuga. A centrifugação à velocidade máxima não aumentará os rendimentos de RNA. A centrifugação a velocidades mais baixas para o carregamento de lisado e a primeira etapa de lavagem também é aceitável, desde que a solução completa seja transferida através da membrana. É altamente recomendado realizar a centrifugação da segunda etapa de lavagem à velocidade máxima.

Todas as etapas de centrifugação devem ser realizadas à temperatura ambiente.

Protocolo: Concentração da amostra

Plasma, soro, urina, líquido cefalorraquidiano, medula óssea e outros fluidos corporais geralmente possuem títulos virais muito baixos. Nesses casos, é recomendável concentrar amostras de até 3,5 ml até um volume final de 140 µl.

Ponto importante antes de começar

- Use microconcentradores centrífugos como o Microsep 100 (Filtron: 3,5 ml, n° de ref. OD100C40), Ultrafree®-CL (Millipore: 2 ml, n° de ref. UFC4 THK 25) ou equivalente de outros fornecedores.

Procedimento

1. Aplique até 3,5 ml de amostra no microconcentrador seguindo as instruções do fabricante.
2. Centrifugue de acordo com as instruções do fabricante até um volume final de 140 µl. Algumas amostras, principalmente as de plasma, podem ser difíceis de concentrar até 140 µl devido à alta viscosidade. A centrifugação por até 6 h pode ser necessária.
3. Pipete 140 µl de amostra concentrada em um tubo da microcentrifuga de 1,5 ml e siga o protocolo de centrifugação do QIAamp DSP Viral RNA na página 32.

Protocolo: Purificação de RNA viral usando uma microcentrífuga ou o QIAcube/QIAcube Connect MDx

Para a purificação de RNA viral de 140 µl de plasma, soro, urina, meio de cultura celular ou fluidos corporais livres de células usando uma microcentrífuga ou automatizada no QIAcube ou no QIAcube Connect MDx. Volumes de partida maiores, de até 560 µl (em múltiplos de 140 µl), podem ser processados aumentando proporcionalmente os volumes iniciais e carregando a coluna de centrifugação QIAamp Mini várias vezes, como descrito abaixo no protocolo. Algumas amostras com títulos virais muito baixos devem ser concentradas antes do procedimento de purificação. Consulte "Protocolo: Concentração da amostra" (página 31).

Pontos importantes antes de começar

- Leia "Procedimento" (páginas 21–28) antes de iniciar o protocolo.
- Todas as etapas de centrifugação são realizadas à temperatura ambiente (15–25 °C).
- O processamento automatizado de 2–10 ou 12 amostras pode ser realizado no QIAcube/QIAcube Connect MDx.
- Para automação, siga as instruções nas fichas de protocolo (QIAcube) ou na tela do software (QIAcube Connect MDx) e consulte os manuais do usuário adequados (para o QIAcube e o QIAcube Connect MDx).

O que fazer antes de começar

- Equilibre as amostras à temperatura ambiente.
- Equilibre o Buffer AVE à temperatura ambiente para eluição na etapa 11.
- Certifique-se de que o Buffer AW1 e o Buffer AW2 tenham sido preparados de acordo com as instruções na página 25.
- Apenas para o procedimento manual: adicione o RNA carreador reconstituído no Buffer AVE ao Buffer AVL, de acordo com as instruções na página 23.

Procedimento

- Para o procedimento manual com a microcentrífuga, siga as etapas 1–11.
 - Este procedimento pode ser automatizado em duas versões diferentes:
 - Padrão: automação completa usando 140 µL de amostra (começando pela etapa 1)
 - Lise manual: parcialmente automatizada com lise manual fora do equipamento (começando após a etapa 4)
1. Pipete 560 µL de Buffer AVL contendo RNA carreador em um tubo de lise (LT).

Se o volume da amostra for maior que 140 µL, aumente a quantidade de Buffer AVL–RNA carreador proporcionalmente (por exemplo, uma amostra de 280 µL exigirá 1120 µL de Buffer AVL–RNA carreador) e use um tubo maior.
 2. Adicione 140 µL de plasma, soro, urina, sobrenadante de cultura celular ou fluido corporal livre de células ao Buffer AVL–RNA carreador no tubo de lise (LT). Misture por agitação em vórtex pulsador durante 15 s.

Para garantir uma lise eficiente, é essencial que a amostra seja completamente misturada no Buffer AVL a fim de produzir uma solução homogênea. Amostras congeladas que foram descongeladas apenas uma vez também podem ser usadas.
 3. Incube à temperatura ambiente por 10 min ± 1 min.

A lise da partícula viral está completa após lise por 10 min à temperatura ambiente.
 4. Centrifugue brevemente o tubo de lise (LT) para remover as gotas de dentro da tampa.

Nota: Se a lise manual (etapas 1–4) tiver sido realizada fora do equipamento, as seguintes etapas (etapas 5–11) podem ser automatizadas no QIAcube ou no QIAcube Connect MDx seguindo as instruções (na tela) para o protocolo de Lise manual.
 5. Adicione 560 µL de etanol (96–100%) à amostra e misture por agitação em vórtex pulsador por ≥15 s. Após misturar, centrifugue brevemente o tubo para remover as gotas de dentro da tampa.

Deve ser usado apenas etanol, pois outros álcoois podem resultar em menor rendimento e pureza do RNA. Não use álcool desnaturado, que contém outras substâncias, como metanol ou metiletilcetona. Se o volume da amostra for maior que 140 µl, aumente a quantidade de etanol proporcionalmente (por exemplo, uma amostra de 280 µl exigirá 1120 µl de etanol). A fim de garantir uma ligação eficiente, é essencial que a amostra seja completamente misturada no etanol para produzir uma solução homogênea.

6. Aplique cuidadosamente 630 µl da mistura da etapa 5 na coluna de centrifugação do QIAamp Mini (em um tubo de lavagem [WT]) sem umedecer a borda. Feche a tampa e centrifugue a aproximadamente 6000 x g durante ≥ 1 min. Coloque a coluna de centrifugação QIAamp Mini em um tubo de lavagem limpo (WT) de 2 ml e descarte o tubo de lavagem contendo o filtrado.

Feche todas as colunas de centrifugação para evitar a contaminação cruzada durante centrifugação.

A centrifugação é realizada a aproximadamente 6000 x g a fim de limitar o ruído da microcentrifuga. A centrifugação à velocidade máxima não afetará o rendimento ou a pureza do RNA viral. Se a solução não tiver atravessado completamente a membrana, centrifugue novamente a uma velocidade mais alta até toda a solução tê-la atravessado.

7. Abra cuidadosamente a coluna de centrifugação QIAamp Mini e repita a etapa 6.

Repita essa etapa até que todo o lisado tenha sido carregado na coluna de centrifugação.

8. Abra cuidadosamente a coluna de centrifugação QIAamp Mini e adicione 500 µl de Buffer AW1. Feche a tampa e centrifugue a aproximadamente 6000 x g durante ≥ 1 min. Coloque a coluna de centrifugação QIAamp Mini em um tubo de lavagem limpo (WT) de 2 ml e descarte o tubo de lavagem contendo o filtrado.

Não é necessário aumentar o volume de Buffer AW1, mesmo que o volume da amostra original fosse maior que 140 µl.

9. Abra cuidadosamente a coluna de centrifugação QIAamp Mini e adicione 500 µl de Buffer AW2. Feche a tampa e centrifugue à velocidade máxima (aproximadamente 20.000 x g) durante 3 min \pm 30 s.

10. Coloque a coluna de centrifugação QIAamp Mini em um novo tubo de lavagem (WT) de 2 ml e descarte o tubo de lavagem contendo o filtrado. Centrifugue à velocidade máxima por 1 min.

11. Coloque a coluna de centrifugação QIAamp Mini em um tubo de eluição limpo (ET). Descarte o tubo de lavagem contendo o filtrado. Abra cuidadosamente a coluna de centrifugação QIAamp Mini e adicione 60 µl de Buffer AVE equilibrado à temperatura ambiente. Feche a tampa e incube à temperatura ambiente durante ≥ 1 min.

Centrifugue a aproximadamente 6000 x g durante ≥ 1 min.

Nota importante: No caso de todos os procedimentos automatizados, remova os eluatos do instrumento diretamente após terminar a execução e armazene-os adequadamente.

Protocolo: Purificação do RNA viral (protocolo de vácuo)

Este protocolo se destina à purificação do RNA viral a partir de 140 µl de plasma, soro, urina, meio de cultura celular ou fluidos corporais livres de células, usando o QIAvac 24 Plus ou coletor de vácuo equivalente. Volumes de partida maiores, de até 560 µl (em múltiplos de 140 µl), podem ser processados aumentando proporcionalmente os volumes iniciais e carregando a coluna de centrifugação QIAamp Mini várias vezes, como descrito abaixo no protocolo. Algumas amostras com títulos virais muito baixos devem ser concentradas antes do procedimento de purificação. Consulte "Protocolo: Concentração da amostra" (página 31).

Pontos importantes antes de começar

- Leia "Procedimento" (páginas 21–28) antes de iniciar o protocolo.
- Todas as etapas de centrifugação são realizadas à temperatura ambiente (15–25 °C).

O que fazer antes de começar

- Equilibre as amostras à temperatura ambiente.
- Equilibre o Buffer AVE à temperatura ambiente para eluição na etapa 14.

- Certifique-se de que o Buffer AW1 e o Buffer AW2 tenham sido preparados de acordo com as instruções na página 25.
- Adicione o RNA carreador reconstituído no Buffer AVE ao Buffer AVL, de acordo com as instruções na página 23.
- Para processamento usando VacConnectors e VacValves, configure o QIAvac 24 Plus conforme descrito na página 29.

Procedimento

1. Pipete 560 µl de Buffer AVL contendo RNA carreador em um tubo de lise (LT).
Se o volume da amostra for maior que 140 µl, aumente a quantidade de Buffer AVL–RNA carreador proporcionalmente (por exemplo, uma amostra de 280 µl exigirá 1120 µl de Buffer AVL–RNA carreador) e use um tubo maior.
2. Adicione 140 µl de plasma, soro, urina, sobrenadante de cultura celular ou fluido corporal livre de células ao Buffer AVL–RNA carreador no tubo de lise (LT). Misture por agitação em vórtex pulsador durante ≥ 15 s.
Para garantir uma lise eficiente, é essencial que a amostra seja completamente misturada no Buffer AVL a fim de produzir uma solução homogênea. Amostras congeladas que foram descongeladas apenas uma vez também podem ser usadas.
3. Incube à temperatura ambiente por 10 min \pm 1 min.
A lise da partícula viral está completa após lise por 10 min \pm 1 min à temperatura ambiente.
4. Centrifugue brevemente o tubo para remover as gotas de dentro da tampa.
5. Adicione 560 µl de etanol (96–100%) à amostra e misture por agitação em vórtex pulsador por ≥ 15 s. Após misturar, centrifugue brevemente o tubo para remover as gotas de dentro da tampa. Insira a coluna de centrifugação QIAamp Mini no VacConnector do coletor de vácuo QIAvac 24 Plus.
Deve ser usado apenas etanol, pois outros álcoois podem resultar em menor rendimento e pureza do RNA. Não use álcool desnaturado, que contém outras substâncias, como metanol ou metiletilcetona. A fim de garantir uma ligação eficiente, é essencial que a amostra seja completamente misturada no etanol para produzir uma solução homogênea. O tubo de coleta do blíster pode ser guardado para a centrifugação da etapa 13.

6. Certifique-se de que a válvula de vácuo principal (entre a bomba de vácuo e o coletor de vácuo) e a válvula de tampa rosqueada (na extremidade do coletor de vácuo QIAvac 24 Plus) estejam fechadas. Ligue a bomba de vácuo pressionando o botão de energia.

O vácuo é aplicado apenas no sistema de conexão (se utilizado) e, não, no coletor de vácuo.

Nota: Para uma liberação rápida e conveniente da pressão do vácuo, devem ser usados o QIAvac Connecting System ou o Vacuum Regulator. Consulte "Materiais necessários, mas não fornecidos" (página 15).

7. Aplique cuidadosamente 630 µl do lisado da etapa 5 na coluna de centrifugação QIAamp Mini sem umedecer a borda. Evite o contato da membrana da coluna de centrifugação QIAamp Mini com a ponteira da pipeta.
8. Abra a válvula de vácuo principal. Certifique-se de deixar a tampa da coluna de centrifugação QIAamp Mini aberta enquanto aplica o vácuo. Depois que todos os lisados tiverem sido retirados da coluna de centrifugação QIAamp Mini, feche a bomba de vácuo principal e abra a válvula de tampa rosqueada para ventilar o coletor. Feche a válvula de tampa rosqueada depois que o vácuo for liberado do coletor.

Depois de fechar a válvula de vácuo principal, o vácuo é aplicado apenas no sistema de conexão (se utilizado) e não no coletor de vácuo. Se os lisados das amostras individuais não tiverem atravessado completamente a membrana apesar de as VacValves de todas as colunas de centrifugação QIAamp Mini estarem fechadas, coloque a coluna de centrifugação QIAamp Mini em um tubo de lavagem (WT) de 2 ml limpo, feche a tampa e centrifugue à velocidade máxima durante 3 min ou até ter atravessado completamente. Continue as etapas de 7 a 11 do protocolo de centrifugação na página 34 para finalizar o procedimento. A centrifugação é realizada a aproximadamente 6000 x g a fim de limitar o ruído da microcentrifuga. A centrifugação à velocidade máxima não afetará o rendimento ou a pureza do RNA viral.

9. Aplique 750 µl do Buffer AW1 na coluna de centrifugação QIAamp Mini sem umedecer a borda. Evite o contato da membrana da coluna de centrifugação QIAamp Mini com a ponteira da pipeta.

10. Abra a válvula de vácuo principal. Depois que todo o Buffer AW1 tiver sido retirado da coluna de centrifugação QIAamp Mini, feche a bomba de vácuo principal e abra a válvula de tampa rosqueada para ventilar o coletor. Feche a válvula de tampa rosqueada depois que o vácuo for liberado do coletor.
11. Aplique 750 µl do Buffer AW2 na coluna de centrifugação QIAamp Mini sem umedecer a borda. Evite o contato da membrana da coluna de centrifugação QIAamp Mini com a ponteira da pipeta. Deixe a tampa da coluna aberta.
12. Abra a válvula de vácuo principal. Depois que todo o Buffer AW2 tiver sido retirado da coluna de centrifugação QIAamp Mini, feche a bomba de vácuo principal e abra a válvula de tampa rosqueada para ventilar o coletor. Feche a válvula de tampa rosqueada depois que o vácuo for liberado do coletor.
13. Feche a tampa da coluna de centrifugação QIAamp Mini. Remova-a do coletor de vácuo e descarte o VacConnector. Coloque a coluna de centrifugação QIAamp Mini em um tubo de lavagem (WT) de 2 ml limpo guardado da etapa 5 e centrifugue, à velocidade máxima, durante 1 min, para secar a membrana completamente.
14. Coloque a coluna de centrifugação QIAamp Mini em um tubo de eluição limpo (ET). Descarte o tubo de coleta contendo o filtrado. Abra cuidadosamente a coluna de centrifugação QIAamp Mini. Adicione 60 µl de Buffer AVE e equilibre à temperatura ambiente. Feche a tampa e incube à temperatura ambiente durante 1 min. Centrifugue à aproximadamente 6000 x g durante ≥1 min.

Controle de qualidade

De acordo com o Sistema de gestão de qualidade com certificado ISO da QIAGEN, todos os lotes do QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit são testados com relação a especificações predeterminadas para garantir uma qualidade consistente do produto.

Limitações














O desempenho do sistema foi estabelecido usando amostras de plasma e soro, fluidos corporais livres de células e sobrenadantes de cultura celular para o isolamento do RNA viral.






É responsabilidade do usuário validar o desempenho do sistema para quaisquer procedimentos usados em seu laboratório que não abrangidos pelos estudos de desempenho da QIAGEN. Para minimizar o risco de um impacto negativo nos resultados do diagnóstico, deve-se utilizar os controles adequados para aplicações a jusante. Para validação adicional, as diretrizes da Conferência Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos (ICH) em *ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (Validação de Procedimentos Analíticos: Texto e Metodologia).

Quaisquer resultados de diagnóstico gerados devem ser interpretados em conjunto com outros resultados clínicos ou laboratoriais.

Símbolos

Os seguintes símbolos podem aparecer nas instruções de uso ou na embalagem e na etiqueta:

Símbolo	Definição do símbolo
	Contém reagentes suficientes para <N> reações
	Data de validade
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Na chegada
	Abra na entrega. Armazene as QIAamp Mini Spin Columns entre 2 °C e 8 °C
	Número de referência
	Número de lote
	Número do material (isto é, etiquetagem do componente)
	Componentes
	Volume
	Adição
	Limites de temperatura
	Fabricante

Símbolo	Definição do símbolo
	Consulte as instruções de uso
	Anote a data atual, depois da adição de etanol no frasco
EtOH	Etanol
CONT	Contém
LYOPH	Liofilizado
RCNS	Reconstituir em
	Resulta em
GuHCl	Cloridrato de guanidina
GITC	Tiocianato de guanidina
GTIN	Número global de item comercial
NUM	Número
Rn	R representa a revisão das Instruções de uso e n representa o número de revisão
	Conservar ao abrigo da luz solar
	Aviso/cuidado

Informações de contato

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Suporte Técnico em **www.qiagen.com/Support**, ligue para 800-362-7737 ou contate um dos Departamentos de Assistência Técnica da QIAGEN ou os distribuidores locais (consulte a contracapa do manual ou visite www.qiagen.com).

Apêndice

Manuseio de RNA

As ribonucleases (RNases) são enzimas muito estáveis e ativas que, geralmente, não precisam de cofatores para funcionar. Como as RNases são difíceis de inativar e cada mínima quantidade é suficiente para destruir o RNA, não use utensílios de plástico ou de vidro sem, primeiro, eliminar possíveis contaminações por RNase. Muito cuidado deve ser tomado, para evitar introduzir, sem querer, RNases na amostra de RNA durante ou depois do procedimento de purificação. Para criar e manter um ambiente sem RNase, as seguintes precauções deverão ser tomadas durante o pré-tratamento e o uso de vasos e soluções descartáveis e não descartáveis, ao trabalhar com RNA.

Manuseio geral

Use sempre uma técnica asséptica e microbiológica adequada ao trabalhar com RNA. Partículas das mãos e de pó podem carregar bactérias e mofo e são as fontes mais comuns de contaminação por RNase. Sempre use luvas de látex ou vinil durante o manuseio de reagentes e amostras de RNA, para evitar contaminações por RNase com origem na superfície da pele ou em poeira do equipamento de laboratório. Troque as luvas com frequência e mantenha os tubos fechados, sempre que possível. Durante o procedimento, trabalhe rapidamente para evitar degradação do RNA por RNases endógenas ou residuais.

Utensílios de plástico descartáveis

O uso de tubos de polipropileno estéreis e descartáveis é recomendado durante o procedimento. Esses tubos, geralmente, não têm RNase e não requerem pré-tratamento para inativar as RNases.

Utensílios de plástico não descartáveis

Utensílios plásticos não descartáveis devem ser tratados, antes de serem usados, para garantir que não tenham RNase. Utensílios de plástico devem ser completamente lavados com NaOH 0,1 M, * 1 mM EDTA*, seguidos por água sem RNase (consulte "Soluções", página 45). Como alternativa, utensílios de plástico resistentes ao clorofórmio podem ser lavados com clorofórmio* para inativar as RNases.

Utensílios de vidro

Utensílios de vidro devem ser tratados antes de serem usados para garantir que não tenham RNase. Utensílios de vidro usados para trabalhar com RNA devem ser limpos com um detergente, † completamente lavados e colocados no forno a >240 °C por quatro horas ou mais (durante a noite, se for mais conveniente) antes de serem usados. Apenas colocar na autoclave não inativará completamente muitas RNases. O cozimento no forno inativará as ribonucleases. Como alternativa, os utensílios de vidro podem ser tratados com DEPC* (pirocarbonato dietílico). Enxágue o utensílio de vidro com DEPC 0,1% (0,1% em água) durante a noite (12 horas) a 37 °C e, depois, coloque na autoclave ou aqueça a 100 °C durante 15 minutos, para eliminar DEPC residual.

Nota: Os tubos Corex® devem ficar livres de RNase por tratamento com DEPC, e não por cozimento. Isso reduzirá a taxa de falha desse tipo de tubo durante a centrifugação.

* Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

† Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

Tanques de eletroforese

Os tanques de eletroforese devem ser limpos com solução detergente (por exemplo, SDS 0,5%)*, enxaguados com água, secos com etanol** e, depois, preenchidos com uma solução de H₂O₂ 3%*. Após 10 minutos à temperatura ambiente, os tanques de eletroforese devem ser enxaguados completamente com água sem RNase.

Soluções

As soluções (água e outras soluções) devem ser tratadas com DEPC 0,1%. O DEPC reagirá com as aminas primárias e não pode ser usado diretamente para tratar tampões Tris*. O DEPC é altamente instável na presença de tampões Tris e se decompõe rapidamente em etanol e CO₂. Ao preparar tampões Tris, trate a água com DEPC primeiro e, depois, dissolva o Tris, para fazer o tampão adequado.

DEPC é um inibidor forte, mas não absoluto, de RNases. É comumente usado a uma concentração de 0,1%, para inativar as RNases em utensílios de vidro ou de plástico ou para criar soluções e água sem RNase. O DEPC inativa as RNases por modificação covalente. Traços de DEPC modificarão os resíduos de purina no RNA por carboxilação. O RNA carboxilado é convertido com muito pouca eficiência em sistemas sem células. No entanto, sua habilidade de formar híbridos DNA:RNA ou RNA:RNA não é gravemente afetada, a menos que uma grande fração dos resíduos de purina tenham sido modificados. O DEPC residual deve sempre ser removido de soluções ou vasos colocando na autoclave ou aquecendo a 100 °C durante 15 minutos.

* Os plásticos usados em alguns tanques de eletroforese não são resistentes ao etanol. Tome os cuidados adequados e verifique as instruções dos fornecedores.

Adicione 0,1 ml de DEPC a 100 ml da solução a ser tratada. Agite vigorosamente para misturar o DEPC na solução ou deixe cozinhar por 12 horas a 37 °C. Coloque na autoclave por 15 minutos para remover qualquer vestígio de DEPC. Talvez seja desejável testar as fontes de água quanto à presença de RNases contaminantes, pois muitas fontes de água destilada são livres de atividade de RNase.

Nota: Os tampões do QIAamp DSP Viral RNA não ficam livres de RNase pelo tratamento com DEPC e, portanto, não estão livres de contaminação com DEPC.

Informações para pedidos

Produto	Conteúdo	Nº de ref.
QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit (50)	Para 50 preparos de RNA: QIAamp Mini Spin Columns, RNA carreador, Tubos de coleta (2 ml) e tampões sem RNase	61904
Produtos relacionados		
QIAcube Connect MDx*	Instrumento e 1 ano de garantia em peças e mão de obra	9003070
Acessórios		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold	Coletor de vácuo para processamento de 1–24 colunas de centrifugação: inclui coletor de vácuo QIAvac 24 Plus, plugues luer, acoplamentos rápidos	19413
VacConnectors	500 conectores descartáveis para uso com colunas de centrifugação QIAamp em conectores luer	19407
Vacuum Regulator	Para uso com coletores QIAvac	19530
Vacuum Pump	Bomba de vácuo universal	84010
VacValves	24 válvulas para uso com o QIAvac 24 e QIAvac 24 Plus	19408
QIAvac Connecting System	Sistema para conectar o coletor de vácuo com a bomba de vácuo: inclui bandeja, frascos de resíduos, acoplamentos, válvulas, medidor e 24 VacValves	19419

Produto	Conteúdo	Nº de ref.
Rotor Adapters	Para 240 preparos: 240 Adaptadores de rotor descartáveis e 240 Tubos de eluição (1,5 ml); para uso com o QIAcube	990394
Rotor Adapter Holder	Suporte para 12 adaptadores de rotor descartáveis; para uso com o QIAcube	990392
Sample Tubes CB	1000 tubos cônicos com tampa rosqueada sem base contornada (2 ml) para uso com o QIAcube e QIAcube Connect	990382
Shaker Rack Plugs	Para carregar o rack do agitador do QIAcube	9017854
Reagent Bottles, 30 ml	Frascos de reagente (30 ml) com tampas; embalagem de 6; para uso com o QIAcube	990393
Filter-Tips, 1000 µl	Ponteiras com filtro descartáveis, no rack; (8 x 128). Para uso com o QIAcube	990352

* O QIAcube Connect MDx não está disponível em todos os países. Para obter mais detalhes, entre em contato com a assistência técnica da QIAGEN.

Para obter informações de licenciamento atualizadas e isenções de responsabilidade específicas do produto, consulte o manual do usuário ou o manual do kit QIAGEN correspondente. Os manuais do usuário e os manuais de kits QIAGEN estão disponíveis em **www.qiagen.com** ou podem ser solicitados à Assistência Técnica da QIAGEN ou ao seu distribuidor local.

Histórico de revisões do documento

Revisão	Descrição
R6, 01/2021	<p>As seguintes seções foram atualizadas: Seções "Purificação de RNA viral automatizada no QIAcube/QIAcube Connect MDx", "Materiais necessários, mas não fornecidos", "Avisos e precauções", "Protocolo: Purificação de RNA viral usando uma microcentrífuga ou o QIAcube/QIAcube Connect MDx", "Símbolos" e "Informações para pedidos".</p> <p>A seção "Referências" foi removida.</p> <p>Uma nova figura foi inserida (imagem do QIAcube Connect MDx)</p> <p>Foram adicionadas referências ao QIAcube Connect MDx e os seus acessórios.</p> <p>Alterações de layout e editoriais.</p>

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Acordo de licença limitada para o QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit

O uso deste produto implica a aceitação, por parte de qualquer comprador ou usuário do produto, dos seguintes termos:

1. O produto só pode ser usado conforme os protocolos facultados com o mesmo e este manual e apenas com componentes contidos no painel. A QIAGEN não concede licença a qualquer uma de suas propriedades intelectuais para usar ou incorporar os componentes incluídos neste painel com quaisquer componentes não incluídos no mesmo, exceto conforme descrito nos protocolos facultados com o produto, neste manual e nos 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. A não ser em relação às licenças expressamente indicadas, a QIAGEN não garante que este painel e/ou seu(s) uso(s) não infringem os direitos de terceiros.
3. Este painel e seus componentes estão licenciados para uso único e não podem ser reutilizados, reconstruídos ou revendidos.
4. A QIAGEN especificamente renuncia a quaisquer outras licenças, declaradas ou implícitas, a não ser àquelas expressamente indicadas.
5. O comprador e o usuário do painel concordam em não realizar nem permitir que outra pessoa realize qualquer etapa que possa levar a ou facilitar qualquer um dos atos proibidos acima. A QIAGEN poderá fazer cumprir as proibições deste Acordo de licença exclusivo em qualquer tribunal e recuperar todas as custas processuais, incluindo os encargos com os advogados, em qualquer ação para fazer cumprir o Acordo de licença exclusivo ou quaisquer direitos de propriedade intelectual relacionados com o painel e/ou seus componentes.

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

Marcas registradas: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube® (QIAGEN Group); Corex® (Corning, Inc.); Tween® (ICI Americas Inc.); UltraFree® (Millipore Corporation); Sarstedt® (Sarstedt AG & Co.). Os nomes registrados, marcas registradas etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcados especificamente como tal, devem ser considerados protegidos pela lei.

01/2021 HB-0418-008 1122786 © 2021 QIAGEN, todos os direitos reservados.

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