



Julho de 2024

Folha do produto

QIAcuityDx[®] Universal MasterMix Kit

Versão 1

IVD

Para uso em diagnóstico in vitro

Para uso laboratorial



REF

260101, 260102



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R1

MAT

1134829PTBR

Sample to Insight

Índice

Conteúdo do kit	3
Envio e armazenamento	4
Estabilidade em uso	4
Uso pretendido	5
Ingredientes ativos	5
Símbolos	6
Informações de segurança	8
Universal MasterMix	9
Informações de emergência	9
Descrição e princípio	10
Notas antes de começar	11
Procedimento	13
Descarte	17
Controle de qualidade	18
Limitações	19
Solução de problemas	20
Informações para pedidos	23
Histórico de revisões do documento	24

Conteúdo do kit

Nº de ref. Kit	260101 1 mL	260102 5 mL
QIAcuityDx Universal MasterMix	1 x 1180 µL	5 x 1180 µL
MgCl ₂ , 200 mM	1 x 1000 µL	2 x 1000 µL
RNase-free water (Água isenta de RNase)	2 x 1,9 mL	5 x 1,9 mL

Envio e armazenamento

O QIAcuityDx Universal MasterMix Kit é enviado em gelo seco. Ele deve ser armazenado imediatamente após o recebimento a -15 a -30 °C em um freezer com temperatura constante. Se qualquer componente do QIAcuityDx Universal MasterMix Kit não chegar ao destino em estado congelado, a embalagem exterior tiver sido aberta durante o transporte ou a remessa não contiver uma guia de remessa ou os reagentes, contate a assistência técnica da QIAGEN ou os distribuidores locais (visite www.qiagen.com).

Quando armazenado corretamente, o QIAcuityDx Universal MasterMix Kit é estável até a data de validade impressa na etiqueta.

Não utilize se for armazenado fora das especificações, se a embalagem estiver danificada ou se houver outros sinais de deterioração ou falha visíveis.

Estabilidade em uso

Uma vez abertos, os reagentes podem ser armazenados nas respectivas embalagens originais entre -15 e -30 °C até a data de validade impressa na embalagem. Evite congelar e descongelar várias vezes. Não exceda um máximo de cinco ciclos de congelamento/descongelamento.

Os reagentes devem ser totalmente descongelados à temperatura ambiente (15–25 °C) por, no máximo, 30 minutos antes do uso.

Uso pretendido

O QIAcuityDx Universal MasterMix Kit é um conjunto de reagentes de mistura principal para dPCR de uso geral, pronto para uso com o instrumento QIAcuityDx Four em conjunto com reagentes associados específicos de ensaio como parte de procedimentos de teste diagnóstico validados.

O QIAcuityDx Universal MasterMix Kit não é um dispositivo automatizado e se destina ao uso em laboratório por pessoal treinado.

O QIAcuityDx Universal MasterMix Kit destina-se apenas para uso diagnóstico *in vitro*.

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

Ingredientes ativos

Reagente	Nome	Ingrediente ativo	Concentração (% w/w)
Mistura principal	QIAcuityDx Universal MasterMix	QuantiNova® DNA Polimerase (5,6 U/μL)	12%
		Mistura dNTP (10 mM cada)	10%
Cloreto de magnésio	MgCl ₂ , 200 mM	Nenhuma	–
Água	RNase-free water (Água isenta de RNase)	Nenhuma	–

Símbolos

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



Este produto atende aos requisitos do Regulamento Europeu (UE) 2017/746 relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*.



Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*



Número de referência



Número de material



Número de lote



Número Global de Item Comercial



Identificador único do dispositivo



Contém



Componente



Número



Data de fabricação

R_n

"R" indica a revisão da Folha do produto e "n" indica o número da revisão

V_n

"V" indica a versão da Folha do produto e "n" indica o número da versão



Data de validade



Limites de temperatura



Fabricante legal



Consulte as instruções de uso



Contém reagentes suficientes para <N> reações



Proteger da luz



Aviso



Risco à saúde

Informações de segurança

Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre utilize 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 da QIAGEN® e para cada componente do kit.

Esteja ciente de que poderá ser necessário consultar os regulamentos locais para 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.

Espécimes e amostras são potencialmente infecciosos. Descarte as amostras e os resíduos dos ensaios de acordo com os procedimentos de segurança locais.

O QIAcuityDx Universal MasterMix Kit contém QuantiNova DNA Polimerase, que é produzida por meio de um processo de fermentação bacteriana. A enzima é purificada dos micróbios no final do processamento para remover qualquer fonte residual de material potencialmente infeccioso.

Universal MasterMix



Contém: 2-metilisotiazol-3(2H)-ona; 1,2,4-triazol. Pode provocar uma reação alérgica cutânea. Pode prejudicar a fertilidade ou o feto. Busque instruções especiais antes de usar. Não manusear até todas as precauções de segurança terem sido lidas e compreendidas. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Em caso de exposição ou suspeita de exposição: Consulte um médico. Armazene em local trancado. Descarte o conteúdo/recipiente em um local de descarte de resíduos aprovado.

Informações de emergência

CHEMTREC

EUA e Canadá: 1-800-424-9300

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

Descrição e princípio

O QIAcuityDx Universal MasterMix Kit é composto por uma mistura principal para dPCR pronta para uso contendo painel químico de reação em tampão PCR e corante de referência patenteado e tubos separados de 200 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) 100% w/w e água isenta de RNase 100% w/w.

Uma lista completa de materiais a serem usados com o QIAcuityDx Universal MasterMix Kit está disponível no *Manual do Usuário do Sistema QIAcuityDx*.

Este protocolo é otimizado para a quantificação de alvos de DNA ou cDNA usando o QIAcuityDx Universal MasterMix Kit com sondas TaqMan® em uma reação singleplex ou multiplex usando o sistema QIAcuityDx.

Notas antes de começar

- Um corante fluorescente é fornecido como um componente do QIAcuityDx Universal MasterMix Kit para detecção confiável do preenchimento adequado da partição nas nanoplacas compatíveis com QIAcuityDx.
- Para a maior eficiência do ensaio dPCR usando sondas TaqMan, os amplicons devem ter idealmente 60–150 pb de comprimento. Semelhante ao qPCR, os amplicons mais longos também podem ser usados, no entanto, o desempenho do ensaio pode ser prejudicado.
- Antes de realizar análises multiplex, escolha combinações adequadas de corantes repórteres e supressores que sejam compatíveis com análises multiplex usando a óptica de detecção do instrumento QIAcuityDx Four (consulte a Tabela 1).

Importante: Uma correção de interferência integrada é aplicada às imagens geradas pelo instrumento QIAcuityDx Four. Esta correção visa minimizar os efeitos da sobreposição espectral entre canais ópticos vizinhos e fluoróforos. O uso de corantes não suportados pode resultar em correção de interferência abaixo da ideal.

Tabela 1. Canais ópticos e fluoróforos suportados para o instrumento QIAcuityDx Four

Canal	Excitação (nm)	Emissão (nm)	Fluoróforos suportados
Green	463–503	518–548	FAM™
Yellow	514–535	550–564	HEX™
Orange	543–565	580–606	TAMRA™
Red	570–596	611–653	ROX™
Crimson	590–640	654–692	Cy5®

- Devem ser usados supressores não fluorescentes com cada sonda. Sondas com supressão dupla podem ser utilizadas para melhorar as relações sinal-ruído em certos ensaios.

- Recomendamos iniciar o desenvolvimento do ensaio com as condições de ciclagem e concentrações de primers especificadas neste protocolo. As condições da ciclagem de PCR devem começar com uma etapa inicial de incubação de 2 minutos a 95 °C para ativar a QuantiNova DNA Polimerase no QIAcuityDx Universal MasterMix Kit.
- Para facilitar o uso, recomendamos preparar uma concentração de 10x ou mais de mistura de primer-sonda contendo primers e sondas específicos para cada um dos seus alvos. Uma mistura de primer-sonda 10x consiste em 1–8 µM de primer direto, 1–8 µM de primer reverso e 0,5–4 µM de sonda em tampão TE com baixo EDTA (0,1 mM).
- Um molde de DNA com comprimento médio >30 kb pode precisar ser fragmentado por digestão de restrição antes do particionamento. A fragmentação enzimática de DNA maior garante a distribuição uniforme do molde por toda a nanoplaca compatível com QIAcuityDx, o que, por sua vez, garante uma quantificação precisa e exata. A digestão de restrição não é necessária para DNA altamente fragmentado (por exemplo, DNA FFPE ou DNA circulante) ou cDNA. Deve-se ter cuidado ao usar enzimas que não cortem a sequência amplificada; portanto, enzimas de restrição são recomendadas.
- As quantidades de entrada de amostra devem ser baseadas nos números de partição da nanoplaca, com um limite superior de 5 cópias por partição ao usar a detecção baseada na sonda TaqMan (Tabela 2). O intervalo ideal de cópias/partições está entre 0,5–3. Se não for possível determinar o número de cópias antes do início do experimento, recomendamos que seja realizado um experimento de titulação inicial para determinar a quantidade ideal de entrada da amostra.

Tabela 2. Número máximo de cópias por reação por tipo de placa

Tipo de placa	Número de partições	Limite superior de cópias por reação	Volume analisado (µL)	Volume total de reação (µL)	Número máximo de cópias por volume analisado	Número máximo estimado de cópias por reação
Nanoplacas 8,5k	8500	5	2,9	13	42.500	170.000
Nanoplacas 26k	26.000	5	24,0	42	130.000	217.000

Procedimento

1. Descongele o QIAcuityDx Universal MasterMix, o cloreto de magnésio, o DNA molde ou cDNA, a mistura de primer-sonda e a água isenta de RNase em temperatura ambiente por no máximo 30 minutos.
2. Misture cada uma das soluções por agitação em vórtex em velocidade máxima por 3–5 segundos. Os tubos devem ser centrifugados brevemente após a mistura para coletar os líquidos no fundo dos tubos.
3. Prepare uma mistura principal de ensaio para o número de reações necessárias de acordo com a Tabela 3, menos o molde/controle sem molde (No Template Control, NTC). Não é necessário manter as amostras no gelo durante a preparação da reação ou durante as etapas subsequentes.

Tabela 3. Configuração recomendada de mistura principal de ensaio

Componente	Volume/poço (nanoplasca 8,5k de 24/96 poços)	Volume/poço (nanoplasca 26k de 24 poços)	Concentração final
QIAcuityDx Universal MasterMix	3,3 µL	11 µL	1x
MgCl ₂ , 200 mM	0,41 µL*	1,38 µL*	6,28 mM*
Mistura de primer-sonda 10x (por ensaio)†	1,32 µL‡	4,4 µL‡	0,1–0,8 µM - primer direto 0,1–0,8 µM - primer reverso 0,05–0,4 µM - sonda
Enzima de restrição (opcional)	Até 1 µL	Até 1 µL	0,025–0,25 U/µL
RNase-free water (Água isenta de RNase)	Variável	Variável	
DNA ou cDNA molde (adicionado na etapa 5)	Variável‡	Variável‡	
Total	13,2 µL	44 µL	

*Concentração inicial recomendada, o volume pode variar dependendo da otimização.

†O volume pode variar, dependendo da concentração da mistura de primer-sonda usada e da concentração alvo final.

‡Os valores apropriados do molde dependem de vários parâmetros, veja as notas antes de começar.

- Misture a mistura principal por agitação em vórtex em velocidade máxima por 3–5 segundos. Centrifugue brevemente.
- Distribua volumes apropriados da mistura principal do ensaio, que contém todos os componentes, exceto o molde/controle sem molde (No Template Control, NTC), em poços de uma placa de PCR padrão ou tubos lo-bind. Em seguida, adicione o NTC/DNA molde em cada poço/tubo no volume apropriado para o seu ensaio (consulte as Notas antes de começar).

Nota: Para RT-PCR de 2 etapas, o volume de cDNA adicionado (da reação de transcrição reversa não diluída) não deve exceder 15% do volume final de PCR.

6. Misture a submistura (molde e mistura principal do ensaio) em uma placa de PCR pipetando para cima e para baixo 10 vezes no poço, ou, se estiver misturando em um tubo, por agitação em vórtex em velocidade máxima por 3–5 segundos. Centrifugue brevemente a placa/tubo para coletar o líquido no fundo do poço/tubo.
7. Transfira o conteúdo de cada poço/tubo imediatamente para os poços da nanoplaca.

Nota: Certifique-se de que nenhuma bolha de ar seja criada durante a transferência para a nanoplaca pipetando até a primeira parada. Certifique-se de pipetar a mistura no poço de entrada e não no poço de saída. Para evitar danos à superfície óptica e reduzir a poeira que interfere na geração de imagens e na análise dos resultados, recomendamos colocar a nanoplaca em uma bandeja para nanoplacas antes de pipetar a mistura de reação na nanoplaca. Realize a limpeza prévia da bandeja de nanoplacas com um lenço sem fiapos antes do uso.

8. Vede as nanoplacas corretamente usando a vedação para nanoplacas fornecida nos kits de placas.

Nota: Para o procedimento exato de vedação, consulte o *Manual do Usuário do Sistema QIAcuityDx*.

9. Se uma enzima de restrição para digestão de DNA tiver sido incluída na reação, deixe a placa por 10 minutos em temperatura ambiente.
10. Programe o ciclador do instrumento QIAcuityDx Four de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4. Condições de ciclagem dPCR recomendadas

Etapa	Tempo	Temperatura (°C)	Nº de ciclos
Ativação de aquecimento inicial de PCR	2 min	95	1
Desnaturação	15 s	95	40*
Combinação de anelamento/extensão*	30 s*	60	

*A temperatura/tempo/número de ciclos pode variar dependendo do tipo de ensaio

11. Coloque a nanoplaca no instrumento QIAcuityDx Four e inicie o programa dPCR de acordo com o *Manual do Usuário do Sistema QIAcuityDx*.

Descarte

Descarte os produtos utilizados e não utilizados em conformidade com os regulamentos locais e nacionais. Siga as recomendações da Folha de Dados de Segurança (Safety Data Sheet, SDS).

Controle de qualidade

De acordo com o sistema de gestão da qualidade com certificação ISO da QIAGEN, cada lote do QIAcuityDx Universal MasterMix Kit é testado de acordo com especificações predeterminadas para garantir a qualidade consistente do produto.

Limitações

O desempenho do QIAcuityDx Universal MasterMix Kit foi estabelecido com os ensaios QIAGEN a jusante aplicáveis. Consulte as respectivas instruções de uso da respectiva aplicação QIAGEN a jusante para obter instruções detalhadas sobre o manuseio deste produto dentro do fluxo de trabalho correspondente.

O usuário é responsável por validar o desempenho de ensaios utilizados em seu laboratório que não estejam abrangidos pelos estudos de desempenho da QIAGEN. Para minimizar o risco de um impacto negativo nos resultados do diagnóstico, devem ser usados controles adequados para aplicações posteriores. Para validação adicional, recomendamos a diretriz da *Conferência Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos (ICH) em ICH Q2(R1) Validação de Procedimentos Analíticos: Texto e Metodologia*.

O QIAcuityDx Universal MasterMix Kit não é produzido sob procedimentos de fabricação estéreis, portanto, pode conter outros ingredientes que podem influenciar a medição. Aplicações a jusante devem incluir controles adequados se isso aumentar o risco de um impacto negativo no resultado do diagnóstico.

Solução de problemas

Esta seção fornece informações sobre o que fazer em caso de problemas com o uso do QIAcuityDx Universal MasterMix Kit. Caso necessite de assistência adicional, entre em contato com a assistência técnica da QIAGEN usando as informações de contato a seguir e você receberá os detalhes de contato específicos do país:

Site: support.qiagen.com

Problema

Comentários e sugestões

Amplificação NTC

Design do ensaio	Redesenhe primers/sondas. Otimize as condições do ensaio variando a concentração da sonda primer e a concentração de $MgCl_2$.
Contaminação em reagentes	Descarte os reagentes e repita o ensaio usando novos reagentes.
Contaminação na configuração do ensaio	Tome precauções contra contaminação descontaminando a área de trabalho usando materiais de limpeza apropriados.

Sem amplificação

Condições de PCR não otimizadas	Aumente o tempo de desnaturação inicial. Aumente o tempo de anelamento/extensão.
Molde inicial insuficiente	Aumentar a quantidade/concentração do molde inicial adicionado à mistura principal do ensaio.

Sinalizador de saturação

Supersaturação de sondas	Diminua o tempo de exposição nos parâmetros de imagem. Diminua o ganho nos parâmetros de imagem.
--------------------------	---

Separação insuficiente entre clusters positivos e negativos

Design do ensaio	Otimize as condições do ensaio variando a concentração da sonda primer e a concentração de $MgCl_2$. Mude para sondas TaqMan com supressão dupla para aumentar a relação sinal-ruído.
Condições de PCR não otimizadas	Aumente o tempo de desnaturação inicial. Aumente o tempo de anelamento/extensão.

Diferenças observadas nos valores de quantificação absoluta entre as execuções

Adição insuficiente de QIAcuityDx Universal MasterMix	Certifique-se de que a concentração final de QIAcuityDx Universal MasterMix na submistura seja 1x (da solução estoque 4x).
---	--

Problema

Comentários e sugestões

Variação no tempo de descongelamento/preparação

Tempos prolongados de descongelamento/preparação podem afetar negativamente os valores de quantificação absoluta. Para obter o desempenho ideal, os reagentes devem ser descongelados por, no máximo, 30 minutos e, depois de preparar a submistura (mistura principal do ensaio + molde), ela deve ser imediatamente carregada na nanoplaca. Se forem necessários tempos de descongelamento/preparação prolongados, eles devem ser limitados a cada ensaio para garantir que quaisquer alterações na quantificação absoluta não afetem os resultados finais.

Condições de PCR não otimizadas

Otimize a temperatura de desnaturação.

Otimize a temperatura de anelamento/extensão.

Resultados inconsistentes entre poços de nanoplacas

Condições de PCR não otimizadas

Otimize o tempo de ativação aumentando de 2 minutos para 15 minutos.

Informações para pedidos

Produto	Conteúdo	N° de ref.
QIAcuityDx Universal MasterMix Kit (1 ml)	Para preparação de até quatro nanoplaças QIAcuityDx: 1 x QIAcuityDx Universal MasterMix, 1 x MgCl ₂ , 200 mM, 2 x água isenta de RNase	260101
QIAcuityDx Universal MasterMix Kit (5 ml)	Para preparação de até vinte nanoplaças QIAcuityDx: 5 x QIAcuityDx Universal MasterMix, 2 x MgCl ₂ , 200 mM, 5 x água isenta de RNase	260102

Manuseie os produtos com o devido cuidado e atenção. Recomendamos que todos os usuários de produtos QIAGEN® sigam todos os regulamentos locais aplicáveis e todas as normas e diretrizes aplicáveis.

Histórico de revisões do documento

Data

Alterações

R1, julho de 2024

Versão inicial

Acordo de licença limitada para o QIAcuityDx® Universal MasterMix Kit

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

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

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

Marcas: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAcuityDx®, QuantiNova® (QIAGEN Group); Cy® (GE Healthcare); Taqman® (Roche Molecular Systems, Inc.); FAM™, HEX™, ROX™, TAMRA™, (Thermo Fisher Scientific ou suas subsidiárias). Os nomes registrados, as marcas registradas etc., usadas neste documento, mesmo quando não marcados especificamente como tal, devem ser consideradas protegidas pela lei.

07/2024 HB-3592-001 © 2024 QIAGEN, todos os direitos reservados.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

