



Julho de 2024

Folheto do produto

QIAcuityDx[®] Universal MasterMix Kit

Versão 1

IVD

Para utilização em diagnóstico in vitro

Para utilização em laboratório



REF

260101, 260102



QIAGEN, GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R1

MAT

1134829PT

Sample to Insight

Índice

Conteúdo do kit	3
Transporte e armazenamento	4
Estabilidade na utilização.....	4
Utilização prevista	5
Ingredientes ativos	5
Símbolos	6
Informações de segurança.....	8
Universal MasterMix	9
Informações para casos de emergência.....	9
Descrição e princípio	10
Notas antes de começar	11
Procedimento.....	13
Eliminação	17
Controlo de qualidade	18
Limitações	19
Resolução de problemas.....	20
Informações para encomendas	23
Histórico de revisões do documento	24

Conteúdo do kit

N.º de cat. 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	2 x 1,9 ml	5 x 1,9 ml

Transporte e armazenamento

O QIAcuityDx Universal MasterMix Kit é expedido em gelo seco. Deve ser armazenado imediatamente após ser recebido, a uma temperatura entre -30 e -15 °C num congelador de temperatura constante. Se qualquer componente do QIAcuityDx Universal MasterMix Kit não chegar ao destino em estado congelado, se a embalagem exterior tiver sido aberta durante o transporte ou se a remessa não contiver uma nota de embalagem ou os reagentes, contacte os Serviços de Assistência da QIAGEN ou os distribuidores locais (visite-nos em www.qiagen.com).

Quando armazenado corretamente, o QIAcuityDx Universal MasterMix Kit mantém-se estável até ao prazo de validade impresso na etiqueta.

Não utilize se for armazenado fora das especificações, se a embalagem tiver sido danificada ou se forem visíveis outros sinais de deterioração ou mau funcionamento.

Estabilidade na utilização

Uma vez abertos, os reagentes podem ser armazenados nas respetivas embalagens originais a uma temperatura entre -30 e -15 °C até ao fim do prazo de validade indicado na embalagem. A descongelação e a congelação repetidas devem ser evitadas. Não exceda um máximo de cinco ciclos de congelação/dcongelação.

Os reagentes devem ser totalmente descongelados à temperatura ambiente (15-25 °C) durante um máximo de 30 minutos antes da utilização.

Utilização prevista

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

O QIAcuityDx Universal MasterMix Kit não é um dispositivo automatizado e destina-se a ser utilizado em laboratório por pessoal com a devida formação.

O QIAcuityDx Universal MasterMix Kit destina-se a ser utilizado em diagnóstico *in vitro*.

O utilizador é responsável por validar o desempenho do sistema quanto a quaisquer procedimentos utilizados no respetivo laboratório que não estejam abrangidos pelos estudos de desempenho da QIAGEN.

Ingredientes ativos

Reagente	Nome	Ingrediente ativo	Concentração (% p/p)
Mistura principal	QIAcuityDx Universal MasterMix	QuantiNova® DNA Polymerase (5,6 U/µl)	12%
		dNTP Mix (10 mM cada)	10%
Cloreto de magnésio	MgCl ₂ , 200 mM	Nenhum	–
Água	Água isenta de RNase	Nenhum	–

Símbolos

Os seguintes símbolos poderão aparecer nas instruções de utilização ou na embalagem e nos rótulos:

	Este produto cumpre os requisitos do Regulamento Europeu (EU) 2017/746 relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico in vitro (RDIV).
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Número de catálogo
	Número do material
	Número de lote
	Número global de item comercial
	Identificação única do dispositivo
	Conteúdo
	Componente
	Número
	Data de fabrico
Rn	R refere-se à revisão do Folheto do produto e n ao número da revisão
Vn	V refere-se à versão do Folheto do produto e n ao número da versão
	Data limite de utilização



Limites de temperatura



Fabricante legal



Consultar as instruções de utilização



<N>

Contém reagentes suficientes para <N> reações



Proteger da luz



Aviso



Perigo para a saúde

Informações de segurança

Ao trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) adequadas. Estas estão disponíveis online no formato PDF prático e compacto em www.qiagen.com/safety, onde é possível encontrar, visualizar e imprimir a FDS de cada kit QIAGEN® e dos componentes do kit.

Tenha em atenção que poderá ser necessário consultar os regulamentos locais para comunicar incidentes graves, que possam ter ocorrido em relação ao dispositivo, ao fabricante e à autoridade reguladora da área de afetação do utilizador e/ou do paciente.

Os espécimes e as amostras são potencialmente infecciosos. Elimine os resíduos de amostras e dos ensaios de acordo com os procedimentos de segurança locais.

O QIAcuityDx Universal MasterMix Kit contém QuantiNova DNA Polymerase, que é produzida através 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



Conteúdo: 2-metilisotiazol-3(2H)-ona; 1,2,4-triazol. Pode provocar uma reação alérgica cutânea. Pode afetar a fertilidade ou o nascituro. Pedir instruções específicas antes da utilização. Não manusear enquanto as precauções de segurança não tiverem sido todas lidas e compreendidas. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Em caso de exposição ou suspeita de exposição: Obter assistência/aconselhamento médico. Armazenar num local fechado à chave. Eliminar o conteúdo/recipiente num local de eliminação de resíduos aprovado.

Informações para casos 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 constituído por uma mistura principal de dPCR pronta a utilizar que contém química de reacção em tampão de PCR e corante de referência patenteado, assim como tubos separados de cloreto de magnésio 200 mM (MgCl_2) 100% p/p e água isenta de RNase 100% p/p.

Uma lista completa de materiais a serem utilizados com o QIAcuityDx Universal MasterMix Kit pode ser encontrada no *Manual do utilizador do QIAcuityDx System*.

Este protocolo é otimizado para a quantificação de alvos de ADN ou ADNc utilizando o QIAcuityDx Universal MasterMix Kit com sondas TaqMan® numa reacção singleplex ou multiplex utilizando o QIAcuityDx System.

Notas antes de começar

- É fornecido como componente do QIAcuityDx Universal MasterMix Kit um corante fluorescente para detecção fiável do preenchimento adequado da partição nas nanoplacas compatíveis com QIAcuityDx.
- Para obter o máximo de eficiência no ensaio de dPCR utilizando sondas TaqMan, os amplicons devem ter, idealmente, 60–150 pb de comprimento. À semelhança do que acontece na qPCR, também podem ser utilizados amplicons mais longos. No entanto, o desempenho do ensaio pode ser prejudicado.
- Antes de realizar análises multiplex, escolha combinações adequadas de corantes repórter e supressores que sejam compatíveis com análises multiplex utilizando a ótica de detecção do instrumento QIAcuityDx Four (consulte a Tabela 1).

Importante: É aplicada uma correção de diafonia integrada às imagens geradas pelo instrumento QIAcuityDx Four. Esta correção visa minimizar os efeitos da sobreposição espectral entre canais óticos vizinhos e fluoróforos. A utilização de corantes não compatíveis pode resultar numa correção de diafonia abaixo do ideal.

Tabela 1. Canais óticos e fluoróforos compatíveis para o instrumento QIAcuityDx Four

Canal	Excitação (nm)	Emissão (nm)	Fluoróforos compatíveis
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 utilizados supressores não fluorescentes com cada sonda. Podem ser utilizadas sondas com dupla supressão para melhorar os rácios sinal-ruído em certos ensaios.

- Recomenda-se que o desenvolvimento do ensaio seja iniciado com as condições de ciclagem e concentrações de primer especificadas neste protocolo. As condições de ciclagem de PCR devem começar com uma etapa de incubação inicial de 2 minutos a 95 °C para ativar a QuantiNova DNA Polymerase no QIAcuityDx Universal MasterMix Kit.
- Para maior facilidade de utilização, recomendamos que seja preparada uma concentração igual ou superior a 10x de mistura de primer-sonda contendo primers e sonda específicos do alvo para cada um de seus alvos. Uma mistura de primer-sonda de 10x é constituída por 1–8 µM de primer direto, 1–8 µM de primer inverso e 0,5–4 µM de sonda em tampão TE com EDTA baixo (0,1 mM).
- Pode ser necessário fragmentar o modelo de ADN com comprimento médio >30 kb por digestão de restrição antes da criação de partições. A fragmentação enzimática de ADN de maior dimensão garante uma distribuição uniforme do modelo em toda a nanoplaca compatível com QIAcuityDx, o que, por sua vez, garante uma quantificação exata e precisa. A digestão por restrição não é necessária no caso do ADN altamente fragmentado (por exemplo, ADN FFPE ou ADN circulante) ou do ADNc. Deve-se ter cuidado ao utilizar enzimas que não cortem dentro da sequência amplificada, sendo, portanto, recomendadas enzimas de restrição.
- As quantidades de entrada de amostra devem basear-se nos números de partição da nanoplaca, com um limite superior de 5 cópias por partição ao utilizar a detecção baseada na sonda TaqMan (Tabela 2). O intervalo ideal de cópias/partição situa-se entre 0,5-3. Se o número de cópias não puder ser determinado antes do início da experiência, recomenda-se que seja realizada uma experiência de titulação inicial para determinar a quantidade ideal de entrada de 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 de reação total (µl)	Máx. número de cópias por volume analisado	Máx. número de cópias estimado por reação
Nanoplacas de 8,5 k	8500	5	2,9	13	42.500	170.000
Nanoplacas de 26 k	26.000	5	24,0	42	130.000	217.000

Procedimento

1. Descongele QIAcuityDx Universal MasterMix, cloreto de magnésio, modelo de ADN ou ADNc, mistura de primer-sonda e água isenta de RNase à temperatura ambiente durante um máximo de 30 minutos.
2. Misture cada uma das soluções agitando em vórtex à velocidade máxima durante 3–5 segundos. Os tubos devem ser centrifugados brevemente após a mistura para recolher 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 modelo/controlo sem modelo (NTC). Não é necessário manter as amostras em gelo durante a preparação da reação ou nas etapas subsequentes.

Tabela 3. Preparação recomendada de mistura principal do ensaio

Componente	Volume/poço (nanoplaças de 24/96 poços, 8,5 k)	Volume/poço (nanoplaças de 24 poços, 26 k)	Concentração final
QIAcuityDx Universal MasterMix	3,3 µl	11 µl	1x
MgCl ₂ , 200 mM	0,41 µl*	1,38 µl*	6,28 mM*
10x mistura de primer-sonda (por ensaio)†	1,32 µl†	4,4 µl†	0,1–0,8 µM de primer direto 0,1–0,8 µM de primer inverso 0,05–0,4 µM de sonda
Enzima de restrição (opcional)	Até 1 µl	Até 1 µl	0,025–0,25 U/µl
Água isenta de RNase	Variável	Variável	
Modelo de ADN ou ADNc (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 utilizada e da concentração alvo final.

‡Os valores apropriados do modelo dependem de vários parâmetros. Consulte as Notas antes de começar.

- Misturar a mistura principal agitando em vórtex à velocidade máxima durante 3–5 segundos. Centrifugar brevemente.
- Distribuir os volumes apropriados da mistura principal do ensaio, que contém todos os componentes exceto o modelo/controlo sem modelo (NTC), nos poços de uma placa de PCR padrão ou tubos lo-bind. Em seguida, adicione modelo de ADN/NTC em cada poço/tubo no volume apropriado ao seu ensaio (consulte as Notas antes de começar).

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

6. Misture a submistura (mistura principal do ensaio e modelo) numa placa de PCR pipetando para cima e para baixo 10 vezes no poço ou, se a mistura for feita num tubo, agitando em vórtex à velocidade máxima durante 3–5 segundos. Centrifugue a placa/tubo brevemente para recolher 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 não são criadas bolhas de ar durante a transferência para a nanoplaca pipetando até ao primeiro ponto de paragem. Certifique-se de que pipeta a mistura para dentro do poço de entrada e para dentro do poço de saída. Para evitar danificar a superfície ótica e reduzir a poeira que irá interferir na imagem e na análise dos resultados, recomendamos que a nanoplaca seja colocada num tabuleiro de nanoplacas antes de pipetar a mistura de reação para dentro da nanoplaca. O tabuleiro de nanoplacas deve ser pré-limpo com um pano sem pelos antes de ser utilizado.

8. Sele as nanoplacas de forma adequada utilizando o selo de nanoplacas fornecido nos kits de placas.

Nota: Para o procedimento de selagem ser efetuado de forma exata, consulte o *Manual do utilizador do QIAcuityDx System*.

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

Tabela 4. Condições de ciclagem de dPCR recomendadas

Etapa	Hora	Temperatura (°C)	N.º de ciclos
Ativação inicial da PCR por calor	2 min	95	1
Desnaturação	15 s	95	40*
Hibridização/extensão combinadas*	30 s*	60	

*Temperatura/tempo/número de ciclos podem variar dependendo do tipo de ensaio

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

Eliminação

Elimine o produto utilizado e por utilizar em conformidade com os regulamentos locais e nacionais. Siga as recomendações da ficha de dados de segurança (FDS).

Controlo de qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade certificado pela norma ISO da QIAGEN, todos os lotes de QIAcuityDx Universal MasterMix Kit são testados face a especificações predeterminadas para garantir uma qualidade constante do produto.

Limitações

O desempenho do QIAcuityDx Universal MasterMix Kit foi estabelecido com os ensaios QIAGEN aplicáveis a jusante. Consulte as respetivas instruções de utilização da aplicação a jusante da QIAGEN correspondente para obter instruções detalhadas sobre o manuseamento deste produto no âmbito do fluxo de trabalho correspondente.

O utilizador é responsável por validar o desempenho dos ensaios utilizados no laboratório que não estejam abrangidos pelos estudos de desempenho da QIAGEN. Para minimizar o risco de um impacto negativo nos resultados de diagnóstico, devem ser utilizados controlos adequados para aplicações a jusante. Para uma validação mais aprofundada, recomenda-se a consulta da diretriz da *International Conference on Harmonization of Technical Requirements (ICH) descrita em ICH Q2 (R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology* (Validação de procedimentos analíticos: texto e metodologia).

O QIAcuityDx Universal MasterMix Kit não é produzido utilizando procedimentos de fabrico estéreis, pelo que pode conter outros ingredientes que podem influenciar a medição. As aplicações a jusante devem incluir controlos adequados se suscitarem o risco de um impacto negativo no resultado do diagnóstico.

Resolução de problemas

Esta secção contém informações sobre o que deve ser feito se ocorrerem problemas durante a utilização do QIAcuityDx Universal MasterMix Kit. Se for necessária mais assistência, contacte os Serviços de Assistência da QIAGEN utilizando as informações de contacto abaixo, que encaminham o utilizador para os dados do contacto específico de cada país:

Site: support.qiagen.com

Problema

Comentários e sugestões

Amplificação NTC

Estrutura do ensaio	Reestruturar primers/sondas. Otimize as condições do ensaio variando a concentração de primer/sonda e a concentração de $MgCl_2$.
Contaminação em reagentes	Elimine os reagentes e repita o ensaio utilizando reagentes novos.
Contaminação durante a preparação do ensaio.	Tome precauções contra a contaminação descontaminando a área de trabalho através da utilização de materiais de limpeza apropriados.

Ausência de amplificação

Condições de PCR não otimizadas	Aumente o tempo de desnaturação inicial. Aumente o tempo de hibridização/extensão.
Modelo inicial insuficiente	Aumente a quantidade/concentração do modelo inicial adicionado à mistura principal do ensaio.

Sinalizador de saturação

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

Separação insuficiente entre grupos positivos e negativos

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

Diferenças observadas nos valores de quantificação absoluta entre execuções

Adição insuficiente de QIAcuityDx Universal MasterMix	Certifique-se de que a concentração final do QIAcuityDx Universal MasterMix na submistura é de $1 \times$ (4x a solução-mãe).
Varição no tempo de descongelamento/preparação	Os tempos de descongelamento/preparação prolongados podem ter um impacto negativo nos valores de quantificação absoluta. Para um desempenho ideal, os reagentes devem ser descongelados durante um máximo de 30 minutos e, uma vez preparada a submistura (mistura principal do ensaio + modelo), esta deve ser imediatamente carregada na nanoplaca. Se forem necessários tempos de descongelamento/preparação prolongados, estes devem ser protegidos ensaio a ensaio para garantir que quaisquer alterações na quantificação absoluta não afetam os resultados finais.

Problema

Comentários e sugestões

Condições de PCR não otimizadas

Otimize a temperatura de desnaturação.

Otimize a temperatura de hibridização/extensão.

Resultados inconsistentes entre poços de nanoplacas

Condições de PCR não otimizadas

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

Informações para encomendas

Produto	Conteúdo	N.º de cat.
QIAcuityDx Universal MasterMix Kit (1 mL)	Para preparação de até quatro QIAcuityDx Nanoplates: 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 QIAcuityDx Nanoplates: 5 x QIAcuityDx Universal MasterMix, 2 x MgCl ₂ , 200 mM, 5 x Água isenta de RNase	260102

O manuseamento dos produtos deve ser efetuado com o todo o cuidado e atenção. Recomendamos a todos os utilizadores de produtos QIAGEN® que sigam todas as regulamentações locais aplicáveis e recomendamos também que sigam todas as normas e diretrizes aplicáveis.

Histórico de revisões do documento

Data

Alterações

R1, julho de 2024 Primeira edição

Contrato de Licença Limitada do QIAcuityDx® Universal MasterMix Kit

A utilização deste produto implica a aceitação dos seguintes termos por parte de qualquer comprador ou utilizador do produto:

1. O produto deverá ser utilizado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e com estas instruções de utilização e recorrendo à utilização exclusiva dos componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para utilizar ou incluir os componentes incluídos neste kit com quaisquer componentes não incluídos neste kit, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, nestas Instruções de utilização e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com. Alguns destes protocolos adicionais foram fornecidos por utilizadores de produtos QIAGEN para utilizadores de produtos QIAGEN. Os referidos protocolos não foram testados de forma exaustiva ou otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não assegura nem garante que os referidos protocolos não infringem os direitos de terceiros.
2. À exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este painel e/ou a sua utilização ou utilizações não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este painel e respetivos componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, recondicionados ou objeto de revenda.
4. A QIAGEN recusa especificamente qualquer outra licença, expressa ou implícita, à exceção das expressamente declaradas.
5. O comprador e o utilizador do painel concordam em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir a ou facilitar qualquer dos atos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de Licença Limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas judiciais e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Contrato de Licença Limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao painel e/ou aos seus componentes.

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

Marcas comerciais: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAcuityDx®, QuantiNova® (Grupo QIAGEN); Cy® (GE Healthcare); Taqman® (Roche Molecular Systems, Inc.); FAM™, HEX™, ROX™, TAMRA™, (Thermo Fisher Scientific ou as respetivas subsidiárias). Os nomes registados, as marcas comerciais, etc. utilizados neste documento, mesmo quando não assinalados especificamente como tal, não devem ser considerados como não protegidos por lei.

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

Esta página foi deixada intencionalmente em branco.

Esta página foi deixada intencionalmente em branco.

Esta página foi deixada intencionalmente em branco.

