

Dezembro 2020

Folha de protocolo do QIASymphony[®] SP

circDNA_2000_DSP_V2 e circDNA_4000_DSP_V2

Este documento é a Folha de protocolo do QIASymphony DSP Circulating DNA Kit, versão 2, R1

Informações gerais

Para utilização em diagnóstico in vitro.

Este protocolo destina-se à purificação de ADN humano de circulação livre de células proveniente de plasma e urina humanos congelados ou frescos, utilizando o QIASymphony SP e o QIASymphony DSP Circulating DNA Kit.

Kit	QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (N.º de cat. 937556)	
Material de amostra	Plasma humano: EDTA ou citrato anticoagulado ou ccfDNA estabilizado Urina humana: estabilizada ou não estabilizada	
Nome do protocolo	circDNA_2000_DSP_V2	circDNA_4000_DSP_V2
Conjunto de controlos de ensaio predefinido	ACS_circDNA_2000_DSP_V2	ACS_circDNA_4000_DSP_V2
Volume de eluição	60 µl	60 µl
Versão de software necessária	Versão 4.0 ou posterior	Versão 5.0 ou posterior

Bandeja "Sample" (Amostra)

Tipo de amostra	Plasma humano (consulte "Preparação do material de amostra") e Urina humana (estabilizada ou não estabilizada)
Volume de amostra	Depende do tipo de tubo de amostra utilizado Para obter mais informações, consulte a lista de material de laboratório, que pode ser encontrada no separador de recursos da página do produto em www.qiagen.com .
Tubos de amostra primários	n/a
Tubos de amostra secundários	Para obter mais informações, consulte a lista de material de laboratório, que pode ser encontrada no separador de recursos da página do produto em www.qiagen.com .
Introdutores	n/a
Outro	É necessário adicionar Proteinase K na ranhura A (posição 1 e/ou 2)

n/a = não aplicável.

Preparação da Proteinase K na bandeja "Sample" (Amostra)

O QIASymphony DSP Circulating DNA Kit contém solução Proteinase K pronta a utilizar que pode ser armazenada à temperatura ambiente (15–25 °C).

Nota: Os tubos que contêm Proteinase K são colocados num transportador de tubos. Os tubos que contêm Proteinase K devem ser colocados nas posições 1 e/ou 2 na ranhura A da bandeja "Sample" (Amostra). Para obter mais informações sobre o tipo de tubo necessário, consulte a lista de material de laboratório, que pode ser encontrada no separador de recursos da página do produto em www.qiagen.com.

Número de amostras*	circDNA_2000_DSP	circDNA_4000_DSP
8	1980 µl	2860 µl
24	3740 µl	6380 µl
48	6380 µl	11,660 µl
72	9020 µl	18,040 µl†
96	11,660 µl	23,320 µl†

* Para cada amostra, são necessários 110 µl para circDNA_2000_DSP ou 220 µl para circDNA_4000_DSP, mais um volume morto adicional de 1100 µl [(n x 110 ou 220 µl) + 1100 µl].

† Para circDNA_4000_DSP: se forem processadas mais de 48 amostras, utilize um segundo tubo. O volume de carregamento máximo por tubo é de 11,660 µl. Para o segundo tubo, é necessário utilizar um volume morto adicional de 1100 µl.

Bandeja "Reagents and Consumables" (Reagentes e consumíveis)

Posição A1 e/ou A2	Cartucho de reagentes
Posição B1	n/a
Suporte de pontas 1-18	Pontas com filtro descartáveis, 200 µl ou 1500 µl
Suporte de caixa de unidades 1-4	Caixas de unidades contendo cartuchos de preparação de amostras ou 8-Rod Covers

n/a = não aplicável.

Bandeja "Waste" (Resíduos)

Suporte de caixa de unidades 1-4	Caixas de unidades vazias
Suporte de saco de resíduos	Saco de resíduos
Suporte do frasco de resíduos líquidos	Frasco de resíduos líquidos vazio

Bandeja "Eluate" (Eluato)

Suporte de eluição (recomenda-se a utilização da ranhura 1, posição de arrefecimento)	Para obter mais informações, consulte a lista de material de laboratório, que pode ser encontrada no separador de recursos da página do produto em www.qiagen.com .
--	---

Material de plástico necessário

Protocolo circDNA_2000_DSP

Material de plástico	Um lote 24 amostras*	Dois lotes 48 amostras*	Três lotes 72 amostras*	Quatro lotes 96 amostras*
Pontas com filtro descartáveis, 200 µl†‡	28	56	84	112
Pontas com filtro descartáveis, 1500 µl†‡	56	112	168	224
Cartuchos de preparação de amostras§	15	30	45	60
8-Rod Covers¶	3	6	9	12

* A utilização de menos de 24 amostras por lote diminui o número de pontas com filtro descartáveis necessárias por ensaio.

† Estão disponíveis 32 pontas com filtro/suporte de pontas com filtro.

‡ O número de pontas com filtro necessárias inclui pontas com filtro para 1 inventariação por cartucho de reagentes.

§ Estão disponíveis 28 cartuchos de preparação de amostras/caixa de unidades.

¶ Estão disponíveis doze 8-Rod Covers/caixa de unidades.

Protocolo circDNA_4000_DSP

Material de plástico	Um lote 24 amostras*	Dois lotes 48 amostras*	Três lotes 72 amostras*	Quatro lotes 96 amostras*
Pontas com filtro descartáveis, 200 µl†	28	56	84	112
Pontas com filtro descartáveis, 1500 µl††	96	192	288	384
Cartuchos de preparação de amostras§	18	36	54	72
8-Rod Covers¶	3	6	9	12

* A utilização de menos de 24 amostras por lote diminui o número de pontas com filtro descartáveis necessárias por ensaio.

† Estão disponíveis 32 pontas com filtro/suporte de pontas com filtro.

†† O número de pontas com filtro necessárias inclui pontas com filtro para 1 inventariação por cartucho de reagentes.

§ Estão disponíveis 28 cartuchos de preparação de amostras/caixa de unidades.

¶ Estão disponíveis doze 8-Rod Covers/caixa de unidades.

Nota: O número de pontas com filtro fornecido pode diferir dos números apresentados no ecrã tátil, dependendo das definições. Recomenda-se o carregamento do número máximo possível de pontas.

Volume de eluição

Volume de eluição selecionado	Volume de eluição inicial
60 µl	75 µl

O volume de eluição é selecionado no ecrã tátil. O volume de eluição médio disponível é ≥ 60 µl. Em casos específicos, o volume de eluato final para amostras individuais pode ter até menos 5 µl do que o volume selecionado (por ex., 55 µl). Recomenda-se que o volume real de eluato seja verificado aquando da utilização de um sistema de configuração de ensaio automatizado, que não verifica o volume de eluato antes da transferência.

Armazenamento de eluatos

Recomenda-se a remoção imediata da placa de eluato da bandeja "Eluate" (Eluato) após a conclusão do ensaio. As placas de eluição podem ser deixadas no QIASymphony SP após a conclusão do ensaio durante a noite (máximo de 16 horas, incluindo o tempo de execução; condições ambientais recomendadas: 18–26 °C e 20–75% de humidade relativa). Dependendo da temperatura e humidade, o eluato pode experimentar condensação ou evaporação.

Após a preparação da amostra, os eluatos podem ser armazenados a 2–8 °C até 1 mês. Para armazenamento a longo prazo, os eluatos podem ser armazenados a temperaturas entre -30 e -15 °C ou entre -90 e -65 °C. Os eluatos congelados não podem ser descongelados mais de 3 vezes.

Preparação do material de amostra

Ao trabalhar com substâncias químicas, usar sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDS) apropriadas, disponíveis no fornecedor do produto.

Pontos importantes antes de começar

- Previna a formação de espuma nas amostras ou sobre as mesmas.
- As amostras devem ser estabilizadas à temperatura ambiente (15–25 °C) antes de iniciar a execução.

Plasma humano

As amostras de sangue tratadas com EDTA ou citrato como anticoagulante podem ser utilizadas para preparação do plasma. Também pode ser utilizado plasma preparado a partir de tubos de colheita de sangue com ccfDNA estabilizado. O plasma é gerado conforme especificado pelo fabricante.

Ao utilizar EDTA ou citrato como anticoagulante, recomenda-se que efetue a separação do plasma imediatamente após a doação de sangue.

Para certas aplicações a jusante, pode ser necessário excluir ou minimizar os ácidos nucleicos das vesículas. Nesses casos, recomenda-se que efetue um passo de centrifugação a alta velocidade a 16 000 x g, durante 10 minutos, à temperatura ambiente (15–25 °C), após a geração de plasma inicial.

Após a colheita e centrifugação, o plasma pode ser armazenado à temperatura ambiente até 7 dias ou a 2–8 °C até 14 dias. Para um armazenamento mais prolongado, recomendamos que congele as alíquotas a -20 °C ou -80 °C. O plasma congelado não pode ser descongelado mais de 3 vezes. Os congelamentos e descongelamentos repetidos levam à desnaturação e precipitação de proteínas, resultando potencialmente na redução do rendimento dos ácidos nucleicos de circulação livres de células. Se os crioprecipitados forem visíveis nas amostras, centrifugue a 6800 x g durante 3 minutos à temperatura ambiente (15–25 °C) e transfira os sobrenadantes para um tubo de amostra secundário sem perturbar os pellets (consulte a lista de material de laboratório, que pode ser encontrada no separador de recursos da página do produto em www.qiagen.com). Inicie imediatamente o procedimento de purificação.

Urina humana

Devido à rápida degradação de ADN de circulação livre de células após a colheita de urina, é altamente recomendado que estabilize as amostras de urina imediatamente.

Urina humana estabilizada

A urina estabilizada pode ser armazenada à temperatura ambiente (15–25 °C) ou a 2–8 °C até 7 dias. Para um armazenamento mais prolongado, recomendamos que congele as alíquotas a temperaturas entre -30 e -15 °C ou -90 e -65 °C.

As amostras de urina estabilizadas não necessitam de nenhum pré-tratamento da amostra. Após a estabilização, recomenda-se que centrifugue as amostras de urina a baixa velocidade (1900 x g) durante 10 minutos à temperatura ambiente (15–25 °C) para remover células antes da extração de ADN de circulação livre de células. Se os precipitados forem visíveis nos sobrenadantes após a centrifugação, aqueça as amostras até 25 °C, em banho-maria, para dissolver os precipitados. Antes de iniciar uma execução, transfira as amostras de urina estabilizadas para um tubo de amostra secundário e, em seguida, carregue este tubo no transportador de tubos (consulte a lista de material de laboratório, que pode ser encontrada no separador de recursos da página do produto em www.qiagen.com).

Urina humana "não estabilizada"

Antes de se iniciar um protocolo que requer Buffer ATL, verifique se se formou precipitado no Buffer ATL. Se necessário, dissolva por aquecimento a 70 °C com agitação lenta em banho-maria. Aspire as bolhas da superfície do Buffer ATL.

Nota: O Buffer ATL (Buffer ATL, 4 x 50 ml, n.º de cat. 939016) não faz parte do QIASymphony DSP Circulating DNA Kit e deve ser encomendado separadamente.

Recomenda-se que centrifugue imediatamente as amostras de urina após a colheita a baixa velocidade (1900 x g) durante 10 minutos à temperatura ambiente (15–25 °C) para remover as células. As amostras de urina não estabilizadas necessitam de pré-tratamento.

Importante: Estabilize as amostras à temperatura ambiente (15–25 °C) antes de iniciar o pré-tratamento.

Importante: A centrifugação e o pré-tratamento devem ser efetuados no prazo de 4 horas após a colheita da amostra de urina.

- Misture 2500 µl de urina (circDNA_2000_DSP) ou 4500 µl de urina (circDNA_4000_DSP) com 250 µl ou 450 µl de Buffer ATL, respetivamente.
- Incube as amostras à temperatura ambiente (15–25 °C) durante 1 hora.

- Centrifugue as amostras a 1900 x g durante 10 minutos à temperatura ambiente (15–25 °C). Se os precipitados forem visíveis no sobrenadante após a centrifugação, aqueça as amostras até 25 °C, em banho-maria, para dissolver os precipitados.
- Transfira os sobrenadantes para um tubo de amostra secundário e, em seguida, carregue este tubo no transportador de tubos (consulte a lista de material de laboratório, que pode ser encontrada no separador de recursos da página do produto em www.qiagen.com)

Importante: A estabilidade e a integridade do ADN de circulação livre de células são limitadas em urina não estabilizada. Recomenda-se que carregue um máximo de um lote de 24 amostras por execução do QIA Symphony para minimizar o tempo das amostras de urina no sistema.

Substâncias interferentes

As amostras de plasma com concentrações elevadas de gamaglobulina (>30 g/l) podem levar à diminuição da recuperação do ADN de circulação livre de células.

Histórico de revisões

Data	Alterações
Versão 2, R1 Dezembro 2020	Versão inicial.

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

Marcas comerciais: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (Grupo QIAGEN). Os nomes registados, as marcas comerciais etc. utilizados neste documento, mesmo quando não assinalados como tal, não devem ser considerados como não protegidos por lei.

12-2020 HB-2309-S02-001 © 2020 QIAGEN, todos os direitos reservados.

Encomendas www.qiagen.com/shop | Assistência técnica support.qiagen.com | Site www.qiagen.com