

cobas[®] DNA Sample Preparation Kit

Para diagnóstico *in vitro*



cobas[®] DNA Sample Preparation Kit

24 Tests

M/N: 05985536190

ÍNDICE

Utilização prevista	3
Princípios do procedimento.....	3
Preparação de amostras.....	3
Materiais e reagentes	4
Materiais e reagentes fornecidos	4
Armazenamento e manuseamento de reagentes	7
Materiais adicionais necessários.....	7
Precauções e requisitos de manuseamento.....	8
Advertências e precauções	8
Boas práticas de laboratório.....	8
Contaminação.....	9
Integridade	9
Eliminação.....	9
Derrames e limpeza.....	9
Colheita, transporte e armazenamento de amostras	10
Colheita e manuseamento de amostras.....	10
Transporte, armazenamento e estabilidade das amostras	10
Armazenamento e estabilidade das amostras processadas.....	10
Procedimento de preparação de amostras.....	10
Utilizando o kit.....	10
Instruções de utilização	10
Quantificação do ADN.....	14
Informações adicionais	15
Símbolos	15
Assistência técnica.....	16
Fabricante e distribuidor	16
Marcas comerciais e patentes	16
Direitos de autor.....	16
Bibliografia	16
Revisão do documento	17

Utilização prevista

O cobas® DNA Sample Preparation Kit é utilizado na preparação manual de amostras, para isolar ADN genómico de amostras de tecido tumoral fixado em formalina e conservado em parafina (FFPET).


Princípios do procedimento



Preparação de amostras

As amostras de FFPET são processadas e o ADN genómico é isolado utilizando o cobas® DNA Sample Preparation Kit, uma preparação manual de amostras com base na ligação dos ácidos nucleicos a fibras de vidro. Uma secção desparafinizada de 5 micra (μm) de uma amostra de FFPET é lisada por incubação a uma temperatura elevada com uma protease e tampão caotrópico de lise/ligação que liberta ácidos nucleicos e protege o ADN genómico libertado das DNases. Subsequentemente, é adicionado isopropanol à mistura de lise que, em seguida, é centrifugada através de uma coluna com um inserto de filtragem de fibra de vidro. Durante a centrifugação, o ADN genómico liga-se à superfície do filtro de fibra de vidro. As substâncias não ligadas, tais como sais, proteínas e outras impurezas, são removidas por centrifugação. Os ácidos nucleicos adsorvidos são lavados e depois eluídos com uma solução aquosa. A quantidade de ADN genómico pode ser determinada espectrofotometricamente e ajustada para uma concentração fixa.

Materiais e reagentes

Materiais e reagentes fornecidos

Kit/Cassetes	Componentes e ingredientes reagentes	Quantidade por teste	Símbolo e advertência de segurança ^a
cobas® DNA Sample Preparation Kit 24 testes (M/N: 05985536190)	DNA TLB (Tampão de lise de tecido de ADN) (M/N: 05517613001) Tampão Tris-HCl Cloreto de potássio 0,04% de EDTA 0,1% de detergente não iónico ^b 0,09% de azida de sódio	1 × 10 ml	N/A
	PK (Proteinase K) (M/N: 05860695102) Proteinase K, liofilizada ^b	1 × 100 mg	 <p>PERIGO</p> <p>H315: Causa irritação na pele. H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea. H319: Provoca irritação ocular grave. H334: Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias. H335: Pode provocar irritação das vias respiratórias.</p> <p>P261: Evitar respirar as poeiras. P264: Lavar a pele cuidadosamente após o manuseamento. P280: Usar luvas de proteção/proteção ocular/proteção facial. P284: Usar proteção respiratória. P304 + P340 + P312: EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. P342 + P311: Em caso de sintomas respiratórios: contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.</p> <p>39450-01-6 Proteinase, <i>Tritirachium album</i> serine</p>

Kit/Cassetes	Componentes e ingredientes reagentes	Quantidade por teste	Símbolo e advertência de segurança ^a
cobas® DNA Sample Preparation Kit 24 testes (M/N: 05985536190)	DNA PBB (Tampão de Ligação de Parafina ADN) (M/N: 05517621001) Tampão Tris-HCl 49,6% de cloridrato de guanidina ^b 0,05% de ureia 20% de detergente não iónico ^b	1 x 10 ml	 <p>ADVERTÊNCIA</p> <p>H302: Nocivo por ingestão. H315: Causa irritação na pele. H319: Provoca irritação ocular grave. H411: Tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. P264: Lavar a pele cuidadosamente após o manuseamento. P273: Evitar a libertação para o ambiente. P280: Usar luvas de proteção/proteção ocular/proteção facial. P337 + P313: Caso a irritação ocular persista: consulte um médico. P391: Recolher o produto derramado. 50-01-1 Cloreto de guanidina 9002-92-0 Polidocanol</p>
	WB I (Tampão de lavagem I de ADN) (M/N: 05517656001) Tampão Tris-HCl 64% de cloridrato de guanidina ^b	1 x 25 ml	 <p>ADVERTÊNCIA</p> <p>H302 + H332: Nocivo por ingestão e por inalação. H315: Causa irritação na pele. H319: Provoca irritação ocular grave. P261: Evitar respirar as névoas ou vapores. P264: Lavar a pele cuidadosamente após o manuseamento. P280: Usar luvas de proteção/proteção ocular/proteção facial. P304 + P340 + P312: EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. P337 + P313: Caso a irritação ocular persista: consulte um médico. P501: Eliminar o conteúdo/recipiente numa instalação de eliminação de resíduos aprovada. 50-01-1 Cloreto de guanidina</p>

Kit/Cassetes	Componentes e ingredientes reagentes	Quantidade por teste	Símbolo e advertência de segurança ^a
cobas® DNA Sample Preparation Kit 24 testes (M/N: 05985536190)	WB II (Tampão de lavagem II de ADN) (M/N: 05517664001) Tampão Tris-HCl Cloreto de sódio	1 × 12,5 ml	N/A
	DNA EB (Tampão de eluição de ADN) (M/N: 05517630001) Tampão Tris-HCl 0,09% de azida de sódio	1 × 6 ml	N/A
	FT (Tubos de filtro com tampas) (M/N: 05089506102)	1 × 25 peças	N/A
	CT (Tubos de colheita) (M/N: 05880513001)	3 × 25 peças	N/A

^a A rotulagem relativa à segurança de produtos baseia-se essencialmente na diretiva GHS da UE.

^b Substâncias perigosas

Armazenamento e manuseamento de reagentes

Reagente	Temperatura de armazenamento	Tempo de armazenamento
cobas® DNA Sample Preparation Kit	15 °C a 30 °C	Uma vez aberto, mantém-se estável durante 8 utilizações ao longo de 90 dias ou até ao fim do prazo de validade indicado, o que primeiro se verificar.

Nota: com exceção do reagente **PK**, não congele os reagentes.

Nota: antes de utilizar, inspecione visualmente cada reagente, para se certificar de que não existem sinais de fugas. Se existir algum indício de derrame, não utilize esse material para testes.

depois de adicionar água esterilizada sem nuclease à **PK**, conserve a **PK** não usada reconstituída em alíquotas de 450 µl a -20 °C. Uma vez reconstituída, a **PK** tem de ser utilizada no prazo de 90 dias ou até ao final do prazo de validade indicado, o que ocorrer primeiro. Depois de adicionar etanol absoluto, conserve o **WB I** e o **WB II** entre 15 °C e 30 °C. Estas soluções de trabalho mantêm-se estáveis durante 90 dias ou até ao fim do prazo de validade indicado, o que ocorrer primeiro.

Materiais adicionais necessários

Materiais	P/N
Xileno (ACS, ≥ 98,5% xilenos)	Qualquer fornecedor
Etanol Absoluto (200 proof, para Biologia Molecular)	Qualquer fornecedor
Isopropanol (ACS, ≥ 99,5%)	Qualquer fornecedor
Água esterilizada, isenta de nucleases (para Biologia Molecular)	Qualquer fornecedor
Lixívia	Qualquer fornecedor
Etanol a 70%	Qualquer fornecedor
Pipetas serológicas de 5 e de 25 ml, esterilizadas e descartáveis	Qualquer fornecedor
Pipetas ajustáveis* (com capacidade para pipetar entre 5 e 1000 µl)	Qualquer fornecedor
Pontas de pipetagem com barreira para aerossóis ou de deslocamento positivo e isentas de DNase	Qualquer fornecedor
Pipet-Aid™*	Qualquer fornecedor
Microcentrífuga de bancada* (com capacidade para centrifugar a 20 000 × g)	Qualquer fornecedor
Dois blocos de aquecimento a seco com capacidade para aquecer tubos de microcentrífuga a 56 °C e a 90 °C*	Qualquer fornecedor
Tubos de microcentrífuga com bloqueio de tampa (1,5 ml, esterilizados, isentos de RNase/DNase, de tipo PCR)	Qualquer fornecedor
Racks de tubos de microcentrífuga	Qualquer fornecedor
Espectrofotómetro para medição da concentração de ADN*	Qualquer fornecedor
Misturador de agitação forte*	Qualquer fornecedor
Congelador capacitado para armazenamento a temperaturas entre -25 °C e -15 °C	Qualquer fornecedor
Termómetros calibrados para bloco de aquecimento a seco*	Qualquer fornecedor
Banho-maria* capaz de manter uma temperatura de 37 °C	Qualquer fornecedor
Lâmina de borda única ou similar	Qualquer fornecedor
Luvas isentas de pó descartáveis	Qualquer fornecedor

* Todos os equipamentos devem ser mantidos de acordo com as instruções do fabricante.

Para mais informações relativamente a materiais vendidos em separado, contacte o representante local da Roche.

Precauções e requisitos de manuseamento

Advertências e precauções

À semelhança do que sucede com qualquer procedimento de teste, boas práticas de laboratório são essenciais para um desempenho adequado deste kit de preparação de amostras.

- Apenas para diagnóstico *in vitro*.
- Estão disponíveis Folhas de Dados de Segurança (SDS, Safety Data Sheets) que podem ser solicitadas ao representante local da Roche.
- Todas as amostras devem ser manuseadas como se estivessem infetadas, utilizando procedimentos de laboratório seguros, tais como os descritos em Biosafety in Microbiological Laboratories¹ e no Documento M29-A4 do CLSI.²
- O DNA PBB e o DNA TLB contêm um detergente não iónico, que é irritante para as membranas mucosas. Evite o contacto com os olhos, a pele e as membranas mucosas.

Nota: *a lixívia líquida doméstica contém habitualmente hipoclorito de sódio a uma concentração de 5,25%. Uma diluição de lixívia doméstica de 1:10 irá dar origem a uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%.*

- O xileno é um produto químico perigoso e deverá ser utilizado numa câmara química. Elimine para junto de desperdícios químicos em conformidade com a legislação local, estadual, federal e do país.
- Recomenda-se a utilização de pipetas esterilizadas descartáveis e de pontas de pipetagem isentas de DNase.
- Para se certificar de que a preparação da amostra é efetuada corretamente, siga rigorosamente as diretrizes e os procedimentos fornecidos. Qualquer desvio destes procedimentos e diretrizes poderá afetar o desempenho ideal do teste.
- Informe as autoridades competentes locais e o fabricante sobre quaisquer incidentes graves que possam ocorrer ao utilizar este ensaio.

Boas práticas de laboratório

- Não efetue pipetagem com a boca.
- Não coma, beba ou fume em áreas de trabalho laboratorial.
- Lave muito bem as mãos depois de manusear amostras e reagentes do kit.
- Ao manusear quaisquer reagentes, use sempre proteção para os olhos, bata de laboratório e luvas descartáveis. Evite o contacto destes materiais com a pele, os olhos ou as membranas mucosas. Se ocorrer contacto, lave imediatamente com água em abundância. Caso não seja efetuado tratamento, podem surgir queimaduras. Se ocorrer derrame, dilua com água antes de limpar com um pano seco.
- Limpe e desinfete cuidadosamente todas as superfícies de trabalho do laboratório com uma solução preparada de fresco de hipoclorito de sódio a 0,5% em água desionizada ou destilada (diluir lixívia doméstica a 1:10). Em seguida esfregue a superfície com um pano com etanol a 70%.

Nota: *a lixívia líquida doméstica contém habitualmente hipoclorito de sódio a uma concentração de 5,25%. Uma diluição de lixívia doméstica de 1:10 irá dar origem a uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%.*

Contaminação

- Para evitar contaminação, devem ser usadas luvas que devem ser trocadas entre o manuseamento de amostras e de reagentes do **cobas**® DNA Sample Preparation Kit. Evite contaminar as luvas quando manusear amostras.
- Para reduzir a possibilidade de contaminação, as luvas devem ser trocadas frequentemente.
- As luvas devem ser trocadas antes de sair das áreas isolamento de ADN ou em caso de suspeita de contacto com soluções ou com uma amostra.
- Evite a contaminação microbiana e por ribonucleases dos reagentes.
- Os materiais e o equipamento devem ser exclusivos de cada atividade e não devem ser usados para outras atividades nem transportados entre áreas. Por exemplo, as pipetas e os materiais utilizados para isolamento de ADN não devem ser utilizados para preparar reagentes para amplificação e deteção.
- Recomenda-se vivamente que o fluxo de trabalho no laboratório prossiga de uma maneira unidirecional, concluindo uma atividade antes de prosseguir com a seguinte. Por exemplo, o isolamento de ADN deve ser concluído antes de iniciar a amplificação e deteção. O isolamento de ADN deve ser efetuado numa área separada da amplificação e deteção.

Integridade

- Não utilize kits fora dos prazos de validade.
- Não agrupe reagentes de lotes ou kits diferentes.
- Não utilize produtos descartáveis que tenham ultrapassado o respetivo prazo de validade.
- Todos os itens descartáveis são de utilização única. Não reutilizar.
- Todos os equipamentos devem ser mantidos adequadamente, de acordo com as instruções do fabricante.

Eliminação

- O **DNA EB** e o **DNA TLB** contêm azida sódica. A azida sódica pode reagir com tubagens de chumbo e de cobre, produzindo azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar soluções contendo azida sódica através dos lavatórios do laboratório, verta nos canos um grande volume de água fria para impedir a formação e acumulação de azidas.
- Elimine os reagentes não utilizados e os resíduos em conformidade com a legislação local, estadual, federal e do país.

Derrames e limpeza

- O **DNA PBB** e o **WB I** contêm cloridrato de guanidina. Caso ocorra derramamento de líquido que contenha este tampão, limpe com detergente laboratorial adequado e água. Se ocorrer um derramamento com agentes potencialmente infecciosos, limpe primeiro a área afetada com detergente laboratorial e água e, em seguida, com hipoclorito de sódio a 0,5%.

Colheita, transporte e armazenamento de amostras

Nota: manuseie todas as amostras tendo em conta a possibilidade de transmitirem agentes infecciosos.

Colheita e manuseamento de amostras

O cobas® DNA Sample Preparation Kit foi desenvolvido para utilização com amostras de FFPET.

Transporte, armazenamento e estabilidade das amostras

As amostras de FFPET podem ser transportadas entre 15 °C e 30 °C. O transporte de amostras de FFPET deve ser efetuado em conformidade com a legislação local, estadual, federal e do país relativa ao transporte de agentes etiológicos.³

Para as recomendações de armazenamento, consulte a secção **Colheita, transporte e armazenamento de amostras** das instruções de utilização específicas do ensaio.

Armazenamento e estabilidade das amostras processadas

Para as recomendações de armazenamento, consulte a secção **Colheita, transporte e armazenamento de amostras** das instruções de utilização específicas do ensaio.

O ADN extraído deve ser utilizado dentro dos períodos de armazenamento recomendados ou antes do fim do prazo de validade do cobas® DNA Sample Preparation Kit utilizado para extrair o ADN, o que primeiro se verificar.

Antes de utilizar stocks de ADN extraído e armazenado, agite em vórtice pulsado e centrifugue o tubo de eluição que contém o stock.

Procedimento de preparação de amostras

Utilizando o kit

Figura 1 Fluxo de trabalho do cobas® DNA Sample Preparation Kit

1	Retirar as amostras e os reagentes do armazenamento
2	Desparafinar amostras
3	Efetuar isolamento de ADN
4	Eluir ADN

Instruções de utilização

Nota: o cobas® DNA Sample Preparation Kit foi desenvolvido para utilização com secções de 5 µm de espessura de amostras de FFPET.

Nota: testes de deteção de mutações poderão ter requisitos específicos para conteúdo tumoral e a necessidade de macro dissecação após a desparafinação.

Nota: os blocos de aquecimento a seco com capacidade para aquecer tubos de microcentrífuga com fixação de tampa deverão ser ligados e programados para 56 °C e 90 °C.

Preparação e armazenamento de reagentes

Prepare reagentes de trabalho conforme indicado na tabela a seguir, antes de utilizar o kit pela primeira vez. Utilize uma pipeta serológica de 5 ml para dispensar a água. Utilize uma pipeta serológica de 25 ml para dispensar o etanol. Caso a proteinase K já tenha sido reconstituída e congelada, descongele um número suficiente de alíquotas para processar o número de amostras a executar.

Reagentes	Reconstituição/Preparação
Proteinase K (PK)	Reconstitua a PK adicionando 4,5 ml de água esterilizada isenta de nucleases (tipo PCR) ao frasco, utilizando uma pipeta serológica esterilizada e descartável de 5 ml. Misture invertendo o frasco 5 a 10 vezes. Coloque uma alíquota de PK reconstituída de 450 µl em tubos de 1,5 ml de microcentrífuga com bloqueio de tampa e armazene a -20 °C durante até 90 dias ou até ao final do prazo de validade, o que primeiro se verificar. Se a PK já tiver sido reconstituída e congelada, descongele um número suficiente de alíquotas para processar o número de amostras a executar (são necessários 70 µl de PK reconstituída para cada amostra).
Tampão de lavagem I (WB I)	Prepare o WB I adicionando 15 ml de etanol absoluto ao frasco de WB I . Misture invertendo o frasco 5 a 10 vezes. Indique no frasco que etanol foi adicionado e em que data. Armazene o WB I entre 15 °C e 30 °C durante até 90 dias ou até ao final do prazo de validade, o que primeiro se verificar.
Tampão de lavagem II (WB II)	Prepare o WB II adicionando 50 ml de etanol absoluto ao frasco de WB II . Misture invertendo o frasco 5 a 10 vezes. Indique no frasco que etanol foi adicionado e em que data. Armazene o WB II entre 15 °C e 30 °C durante até 90 dias ou até ao final do prazo de validade, o que primeiro se verificar.

Todas as soluções conservadas entre 15 °C e 30 °C deverão ser transparentes. Se estiver presente precipitado em algum reagente, aqueça a solução em banho-maria a 37 °C até que o precipitado se dissolva. Não utilize até que todo o precipitado esteja dissolvido.

Desparafinação de secções de FFPET montadas em lâminas

Nota: o xileno é um produto químico perigoso. Todos os procedimentos de desparafinação deverão ser executados sob uma câmara química. Consultar **Advertências e precauções**.

1. Adicione uma lâmina com uma secção de FFPET de 5 µm a um recipiente com xileno suficiente para cobrir o tecido; deixe embeber durante 5 minutos.
2. Transfira a lâmina para um recipiente com etanol absoluto suficiente para cobrir o tecido; deixe embeber durante 5 minutos.
3. Retire a lâmina do etanol e deixe secar totalmente a secção ao ar (5 a 10 minutos).
4. Efetue macrodissecação, se necessário.
5. Para cada amostra, rotule um tubo de microcentrífuga com bloqueio de tampa de 1,5 ml com a informação de identificação de amostra.
6. Adicione 180 µl de **DNA TLB** ao tubo de microcentrífuga com bloqueio de tampa de 1,5 ml.
7. Adicione 70 µl de **PK** reconstituída ao tubo de microcentrífuga com bloqueio de tampa que contém o **DNA TLB**.
8. Raspe o tecido da lâmina e coloque-o no tubo de microcentrífuga com bloqueio de tampa. Mergulhe o tecido na mistura **DNA TLB/PK**.
9. Continue com o passo 1 do **Procedimento de isolamento do ADN**.

Desparafinação de secções de FFPET não montadas em lâminas

Nota: o xileno é um produto químico perigoso. Todos os procedimentos de desparafinação deverão ser executados sob uma câmara química. Consultar **Advertências e precauções**.

Nota: se a amostra necessitar de macrodissecação, a secção deve ser montada numa lâmina e deve ser seguido o procedimento pormenorizado em **Desparafinação de secções de FFPET montadas em lâminas**.

1. Para cada amostra, coloque uma secção de FFPET de 5 µm num tubo de microcentrífuga de 1,5 ml com bloqueio de tampa e rotulado com a informação de identificação de amostra.
2. Adicione 500 µl de xileno ao tubo de microcentrífuga com bloqueio de tampa que contém a secção de FFPET.
3. Misture bem com agitação forte durante 10 segundos.
4. Deixe o tubo repousar durante 5 minutos entre 15 °C e 30 °C.
5. Adicione 500 µl de etanol absoluto e misture bem com agitação forte durante 10 segundos.
6. Deixe o tubo repousar durante 5 minutos entre 15 °C e 30 °C.
7. Centrifugue entre 16 000 × g e 20 000 × g durante 2 minutos. Remova o sobrenadante sem perturbar o pellet. Elimine o sobrenadante juntamente com os desperdícios químicos.
8. Adicione 1 ml de etanol absoluto e misture com agitação forte durante 10 segundos.
9. Centrifugue entre 16 000 × g e 20 000 × g durante 2 minutos. Remova o sobrenadante sem perturbar o pellet. Elimine o sobrenadante juntamente com os desperdícios químicos.
10. Se o pellet ficar a flutuar no sobrenadante restante, centrifugue novamente durante 1 minuto entre 16 000 × g e 20 000 × g. Remova qualquer sobrenadante restante.
11. Seque o pellet de tecido durante 10 minutos a 56 °C num bloco de aquecimento com o tubo aberto.
12. Certifique-se de que o etanol está totalmente evaporado e o pellet está seco antes de prosseguir com o passo seguinte.
13. Caso necessário, os pellets secos podem ser conservados durante um máximo de 24 horas entre 2 °C e 8 °C.
14. Suspenda novamente o pellet de tecido em 180 µl de **DNA TLB**.
15. Adicione 70 µl de **PK** reconstituída.
16. Continue com o passo 1 da secção a seguir: **Procedimento de isolamento do ADN**.

Procedimento de isolamento do ADN

Nota: caso seja necessário para o teste, processe um controlo negativo simultaneamente com a(s) amostra(s). Prepare o controlo negativo combinando 180 µl de **DNA TLB** e 70 µl de solução de **PK** num tubo de microcentrífuga com bloqueio de tampa de 1,5 ml rotulado como **NEG**. O controlo negativo deverá ser processado seguindo o mesmo procedimento que o das amostras.

1. Misture com agitação forte os tubos que contêm a mistura de amostra/**DNA TLB/PK** e a mistura de controlo negativo (**NEG**) durante 30 segundos.

Nota: o tecido tem de ser totalmente imerso na mistura **DNA TLB/PK**.

2. Coloque os tubos no bloco de aquecimento a seco, a 56 °C e incube durante 60 minutos.
3. Misture com agitação forte os tubos durante 10 segundos.

Nota: o tecido tem de ser totalmente imerso na mistura **DNA TLB/PK**.

4. Coloque os tubos no bloco de aquecimento a seco, a 90 °C e incube durante 60 minutos.

Nota: durante a incubação, prepare o número necessário de tubos de filtro (**FT**) com tampas de dobradiça, colocando o **FT** num tubo de colheita (**CT**) e rotule cada tampa de **FT** com a identificação do controlo ou da amostra adequada.

Nota: cada amostra necessitará de 1 FT, 3 CT e 1 tubo de eluição (tubo de microcentrífuga com bloqueio de tampa de 1,5 ml).

Nota: durante a incubação, rotule o número necessário de tubos de eluição (tubos de microcentrífuga de 1,5 ml) com a informação da identificação correta da amostra ou do controlo.

5. Deixe os tubos arrefecer para uma temperatura entre 15 °C e 30 °C. Depois de arrefecerem, centrifugue os tubos para recolher o líquido das tampas.
6. Adicione 200 µl de DNA PBB a cada tubo; misture pipetando para cima e para baixo 3 vezes.
7. Incube o tubo a uma temperatura entre 15 °C e 30 °C durante 10 minutos.
8. Adicione 100 µl de isopropanol a cada tubo; misture o lisado pipetando para cima e para baixo 3 vezes.
9. Transfira cada lisado para a unidade de FT/CT adequadamente rotulada.
10. Centrifugue as unidades de FT/CT a 8000 × g durante 1 minuto.
11. Coloque cada FT num novo CT. Elimine o fluxo do CT antigo para junto dos resíduos químicos e elimine adequadamente o CT usado.
12. Adicione 500 µl de WB I de trabalho a cada FT.

Nota: a preparação do WB I de trabalho está descrita na secção **Preparação de reagentes**.

13. Centrifugue as unidades de FT/CT a 8000 × g durante 1 minuto.
14. Elimine o fluxo de cada CT para junto dos desperdícios químicos. Coloque o FT de volta no mesmo CT.
15. Adicione 500 µl de WB II de trabalho a cada FT.

Nota: a preparação do WB II de trabalho está descrita na secção **Preparação de reagentes**.

16. Centrifugue as unidades de FT/CT a 8000 × g durante 1 minuto.
17. Coloque cada FT num novo CT. Elimine o fluxo do CT antigo para junto dos resíduos químicos e elimine adequadamente o CT usado.
18. Centrifugue as unidades FT/CT a 16.000–20.000 × g durante 1 minuto para secar as membranas dos filtros.
19. Coloque cada FT num tubo de eluição (tubo de microcentrífuga de 1,5 ml) pré-rotulado com a identificação da amostra ou do controlo. Elimine o fluxo do CT usado para junto dos resíduos químicos e elimine adequadamente o CT usado.
20. Adicione 100 µl de DNA EB ao centro de cada membrana do FT sem tocar na membrana do FT.
21. Incube o FT com o tubo de eluição a uma temperatura entre 15 °C e 30 °C durante 5 minutos.
22. Centrifugue o FT com o tubo de eluição a 8000 × g durante 1 minuto para recolher o eluato no tubo de eluição. Elimine adequadamente o FT usado.
23. Feche a tampa do tubo de eluição. O tubo de eluição contém o stock de ADN.
24. Para a quantificação do ADN, prossiga para a secção **Quantificação do ADN**.

Nota: a medição da concentração de ADN deverá ser efetuada imediatamente após o procedimento “Isolamento do ADN” e antes do armazenamento.

Quantificação do ADN

1. Misture com agitação forte cada stock de ADN durante 5 segundos.
2. Quantifique o ADN utilizando um espectrofotómetro de acordo com o protocolo do fabricante. Utilize o DNA EB como o branco do equipamento. Em média, são necessárias duas leituras consistentes.

Nota: *as duas medições deverão estar a $\pm 10\%$ uma da outra quando as leituras de concentração de ADN forem $\geq 20,0$ ng/ μ l. Para leituras de concentração de ADN $< 20,0$ ng/ μ l, as duas medições deverão estar dentro de ± 2 ng/ μ l. Se as duas medições não estiverem dentro de $\pm 10\%$ uma da outra quando as leituras de concentração de ADN forem $\geq 20,0$ ng/ μ l ou dentro de ± 2 ng/ μ l quando as leituras de concentração de ADN forem $< 20,0$ ng/ μ l, devem ser efetuadas outras 2 leituras até os requisitos serem satisfeitos. Deverá ser então calculada a média destas duas novas medições.*

Nota: *se for necessário um controlo negativo totalmente processado (NEG), o stock de ADN do NEG não necessita de ser medido.*

Nota: *o ADN extraído e armazenado deve ser amplificado dentro dos períodos de armazenamento recomendados nas instruções de utilização específicas do ensaio ou antes do fim do prazo de validade do cobas® DNA Sample Preparation Kit utilizado para extrair o ADN, o que primeiro se verificar.*





















































Nota: *para a concentração de ADN necessária para os testes, consulte instruções de utilização específicas do ensaio.*

Informações adicionais

Símbolos

Os seguintes símbolos são utilizados em etiquetas de produtos de diagnóstico por PCR da Roche.

Tabela 1 Símbolos utilizados em etiquetas de produtos de diagnóstico por PCR da Roche

 Idade ou data de nascimento	 Dispositivo não para testes efetuados próximo dos pacientes	 UI QS por reação PCR, utilize as Unidades Internacionais QS (UI) por reação PCR no cálculo dos resultados.
 Software auxiliar	 Dispositivo não para autotestes	 Número de série
 Intervalo atribuído (cópias/ml)	 Distribuidor <i>(Nota: o país/região aplicável poderá estar indicado por baixo do símbolo.)</i>	 Centro
 Intervalo atribuído (UI/ml)	 Não reutilizar	 Procedimento padrão
 Representante autorizado na Comunidade Europeia	 Mulher	 Esterilizado com óxido de etileno
 Folha de dados de códigos de barras	 Apenas para avaliação do desempenho IVD	 Armazenar no escuro
 Número do lote	 Global Trade Item Number	 Limite de temperatura
 Risco biológico	 Importador	 Ficheiro de definição de teste
 Referência de catálogo	 Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Este lado para cima
 Marcação de conformidade CE; este dispositivo está em conformidade com os requisitos aplicáveis para marcação CE de um dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	 Limite inferior do intervalo atribuído	 Procedimento ultrasensível
 Data da colheita	 Homem	 Identificação exclusiva do equipamento
 Consulte as instruções de utilização	 Fabricante	 Limite superior do intervalo atribuído
 Conteúdo suficiente para <n> testes	 Controlo negativo	 Linha de enchimento da urina
 Conteúdo do kit	 Não esterilizado	 Apenas nos EUA: a Lei federal dos Estados Unidos restringe a venda deste dispositivo a um profissional licenciado ou a pedido deste.
 Controlo	 Nome do paciente	 Prazo de validade
 Data do fabrico	 Número do paciente	
 Dispositivo para testes efetuados próximo dos pacientes	 Abra aqui	
 Dispositivo para autotestes	 Controlo positivo	
	 Cópias QS por reação PCR, utilize as cópias QS por reação PCR no cálculo dos resultados.	

Assistência técnica

Para apoio técnico (assistência) entre em contacto com a sua filial local:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Fabricante e distribuidor

Tabela 2 Fabricante e distribuidor



Roche Diagnostics GmbH
 Sandhofer Strasse 116
 68305 Mannheim, Germany
www.roche.com

Fabricado nos EUA

Distributed by Roche Diagnostics
 9115 Hague Road
 Indianapolis, IN 46250-0457 USA
 (For Technical Assistance call the
 Roche Response Center
 toll-free: 1-800-526-1247)¹

¹ Para os EUA, apenas.

Marcas comerciais e patentes

Consulte <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

Direitos de autor

©2024 Roche Molecular Systems, Inc.



Bibliografia

1. Chosewood LC, Wilson DE. Biosafety and microbiological and biomedical laboratories-Fifth Edition. US Department of Health and Human Services Publication, CDC. 2009;21-1112.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4: Wayne, PA; CLSI, 2014.
3. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 60th Edition. 2019.

Revisão do documento

Informações de revisão do documento	
Doc Rev 3.0 04/2024	Atualizadas informações sobre advertências de perigo. Secção Marcas comerciais e patentes atualizada, incluindo o link. Indicação de autoridade competente atualizada. Se tiver quaisquer questões, por favor contacte o representante local da Roche.

O resumo de relatório de segurança e de desempenho pode ser utilizado com o seguinte link:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>