

# Instruções de uso (Características de desempenho) do QIAamp<sup>®</sup> DSP Circulating NA Kit

Versão 2



Para uso em diagnóstico in vitro  
Para uso com o QIAamp DSP Circulating NA Kit



61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Alemanha

R1

As características de desempenho estão disponíveis eletronicamente e podem ser encontradas na guia de recursos da página de produto em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Introdução geral

O QIAamp DSP Circulating NA Kit é um sistema que usa tecnologia de membrana de sílica (tecnologia QIAamp) para o isolamento manual e a purificação de DNA e RNA circulante e livre de células (circulating cell-free, ccf) de amostras de plasma sanguíneo humano.

O produto deve ser usado por usuários profissionais, como técnicos e médicos, que são treinados em técnicas biológicas moleculares.

O QIAamp DSP Circulating NA Kit deve ser usado para diagnóstico in vitro.

## Rendimento de ácidos nucleicos (nucleic acids, NA) purificados

As amostras de plasma podem apresentar uma variação alta no rendimento de ácidos nucleicos purificados. Portanto, os usuários devem otimizar a inserção de plasma e volume de eluição para os alvos específicos e aplicações a jusante em seus laboratórios.

Se o kit estiver sendo usado em conjunto com uma aplicação QIAGEN® a jusante, consulte o manual relevante para obter instruções.

# Análise de aplicações a jusante

Os ácidos nucleicos isolados com o QIAamp DSP Circulating NA Kit estão prontos para o uso em diferentes aplicações a jusante. Para avaliar o desempenho, os ácidos nucleicos do plasma sanguíneo humano de doador individual foram isolados usando três tubos de coleta de sangue diferentes (BD Vacutainer® K2EDTA Tube, Becton Dickinson and Company; PAXgene® Blood ccfDNA Tube, PreAnalytiX GmbH; e Streck® Cell-Free DNA Blood Collection Tube (BCT)®, Streck; *n*=24 doadores cada). Os eluatos de cada inserção de plasma de 1 ml foram testados usando PCR quantitativo (quantitative PCR, qPCR, Figura 1A), PCR digital em gotas (digital droplet PCR, ddPCR, Figura 1B), bem como qPCR de transcrição reversa (reverse transcription qPCR, RT-qPCR) para RNA (somente de BD Vacutainer K2EDTA Tube plasma, Figura 2).

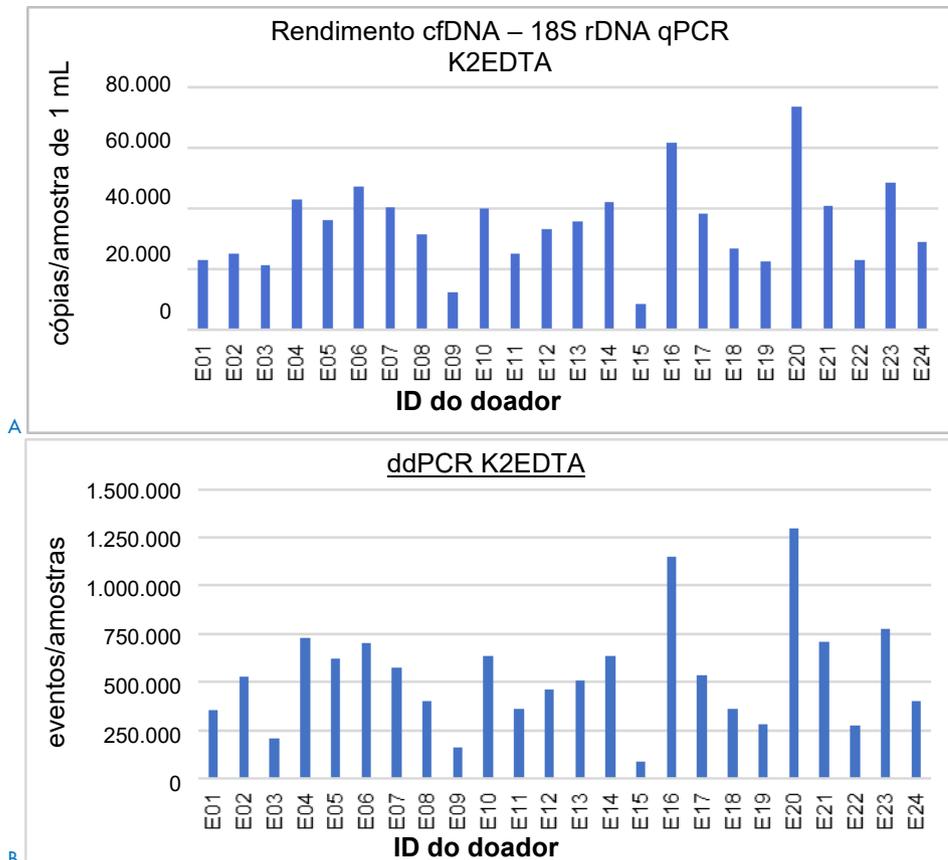


Figura 1. Comparação de plasma de doador individual (inserção de 1 ml) entre qPCR e ddPCR (Bio-Rad®)

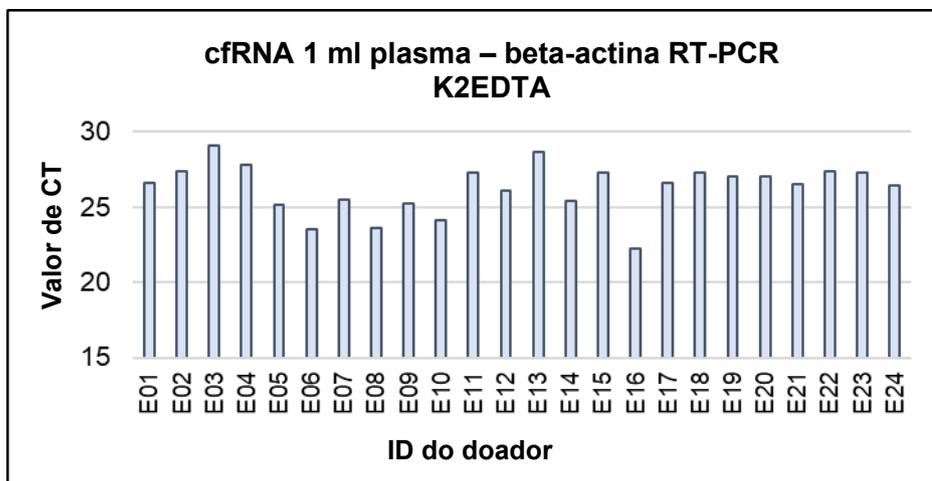


Figura 2. Detecção de RNA livre de células em plasma de doador individual (inserção de 1 ml) usando um ensaio de RT-qPCR para o gene de beta-actina humano (fragmento com comprimento de 293 bp).

Para a análise de sequenciamento de próxima geração (Next-Generation Sequencing, NGS), foram gerados eluatos com volume de inserção de plasma a partir de 5 ml (BD Vacutainer K2EDTA Tube, PAXgene Blood ccfDNA Tube e Streck Cell-Free DNA BCT;  $n=8$  doadores cada). O rendimento total de DNA para 5 ml de plasma variou entre 50 e 150 ng de DNA detectado com o ensaio Qubit® HS dsDNA. A análise de NGS foi realizada usando o GeneRead® QIAAct Actionable Insights Tumor Panel e o sistema GeneReader®. Todas as amostras foram enriquecidas com êxito e as bibliotecas foram geradas. Mais de 98% das leituras geradas foram mapeadas para o genoma humano e mais de 99,8% das posições nas regiões de interesse tiveram uma cobertura de base de  $\geq 500x$ .

Para ambas as espécies de ácidos nucleicos (DNA e RNA), a aplicação de tecnologias a jusante foi demonstrada com êxito (Figura 3).

	qPCR	ddPCR	RT-qPCR	NGS
K2EDTA	✓	✓	✓	✓
PAXgene	✓	✓	não testado	✓
Streck	✓	✓	não testado	✓

Figura 3. Uso bem-sucedido de ácidos nucleicos isolados com diferentes aplicações a jusante.

O usuário deve otimizar a inserção de plasma e o volume de eluição para suas moléculas alvo e quaisquer procedimentos subsequentes usados em seu laboratório ou consultar o desempenho específico da aplicação a jusante relevante.

## Estabilidade do eluato

A estabilidade do eluato dependerá do conteúdo e do tipo de ácidos nucleicos isolados, do volume de eluição e das condições de armazenamento. Recomendamos que os usuários estabeleçam a estabilidade do eluato em função dos seus requisitos específicos.

A estabilidade do eluato foi testada para DNA e eluatos derivados de plasma humano gerados a partir do BD Vacutainer K2EDTA Tube (Becton Dickinson and Company) e tubos de coleta de sangue estabilizadores (PAXgene Blood ccfDNA Tube e Streck Cell-Free DNA BCT). Os eluatos foram armazenados a -30 a -15 °C e -90 a -65 °C. Nenhuma deterioração foi observada por até 12 meses. Os eluatos armazenados a 2–8 °C e em temperatura ambiente (15–25 °C) ficaram estáveis por até 48 horas. Todas as condições foram avaliadas usando qPCR visando o gene 18S rDNA humano.

A estabilidade do eluato foi testada para RNA e eluatos derivados do plasma humano gerados a partir dos BD Vacutainer K2EDTA Tubes (Becton Dickinson and Company). Os eluatos foram armazenados a -30 a -15 °C e -90 a -65 °C. Nenhuma deterioração foi observada por até 6 meses. Os eluatos armazenados a 2–8 °C ficaram estáveis por até 48 horas. Todas as condições foram avaliadas usando RT-qPCR visando o gene beta-actina humano.

Se o kit estiver sendo usado em conjunto com aplicações QIAGEN a jusante, consulte o manual do kit relevante para obter instruções.

## Precisão do isolamento de NA

A precisão foi avaliada usando plasma humano e as condições foram avaliadas usando qPCR visando o gene 18S rDNA humano.

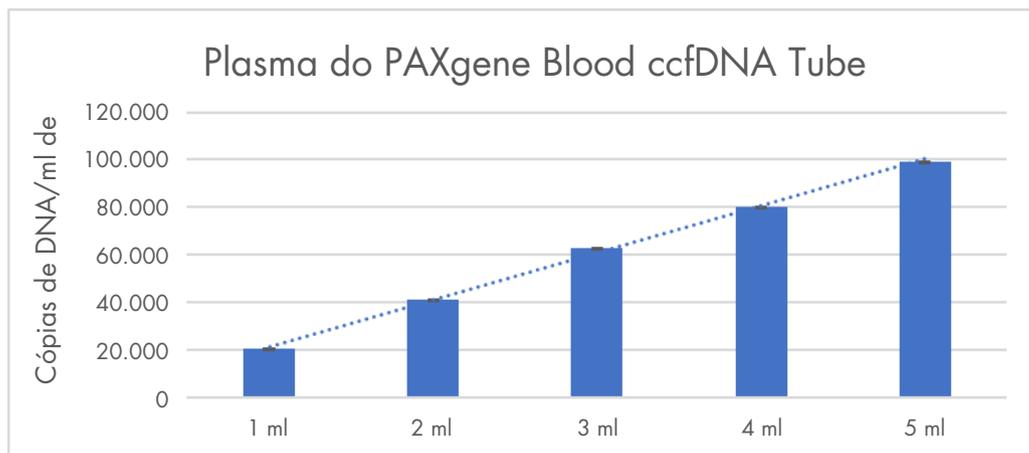
A configuração experimental abrangeu 12 execuções de purificação com 12 réplicas cada (total de 144 purificações). As execuções de purificação foram organizadas com três operadores diferentes, em três dias diferentes, com três instrumentos usando três lotes diferentes do QIAamp DSP Circulating NA Kit. O desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (coefficient of variation, CV) foram determinados para cada parâmetro individual e para a variabilidade geral (total) do QIAamp DSP Circulating NA Kit (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados de precisão

Parâmetro	Precisão		
	Média de cópias/ml	DP	CV (%)
Execução para execução	25.894	461	1,78
Operador para operador		1392	5,38
Instrumento para instrumento		228	0,88
Dia para dia		2096	8,09
Lote para Lote		969	3,74
Total		3120	12,05

## Linearidade

Os dados foram gerados para volumes de inserção de plasma de 1–5 ml, a partir do sangue armazenado nos BD Vacutainer K2EDTA Tubes, PAXgene Blood ccfDNA Tubes e Streck Cell-Free DNA BCTs. Para todos os BCTs, foi observado um aumento linear no rendimento de DNA (consulte a Figura 4); no casos dos BD Vacutainer K2EDTA Tubes, ocorreu o mesmo para o RNA.



**Figura 4. Aumento linear de rendimento de DNA total (cópia de DNA/ml de inserção de plasma) para diferentes volumes de inserção de plasma.** Demonstração dos dados do plasma gerado a partir do PAXgene Blood ccfDNA Tube, resultados equivalentes do plasma derivado do BD Vacutainer K2EDTA Tube (DNA/RNA) e Streck Cell-Free DNA BCT.

## Equivalência de protocolos (protocolos Breeze e Clássico)

A equivalência no desempenho entre o protocolo breeze e o protocolo clássico foi determinada ao demonstrar que o limite de confiança de 95% da diferença no valor Ct médio (RNA) ou média de cópia/ml (DNA) correspondente foi de  $\pm 2 \times DP$ , sendo o DP a precisão observada do protocolo clássico (condição de referência). Foram usados três lotes de kits e três operadores realizaram os experimentos.

A precisão total (DP) dos valores Ct gerados para o protocolo breeze foi menor que o limite superior do intervalo de previsão de 95% bilateral para a precisão total (DP) do protocolo clássico, onde o intervalo de precisão foi calculado ao longo do estudo usando os dados do protocolo clássico ( $n=143$ ) e usando o número de pontos de dados do protocolo breeze ( $n=144$ ) no estudo.

## Substâncias interferentes

As substâncias potencialmente interferentes podem ter origem em diferentes fontes, por exemplo, metabólitos naturais, substâncias introduzidas durante o tratamento do paciente ou substâncias ingeridas por ele. No QIAamp DSP Circulating NA Kit, a hemoglobina, triglicerídeos, EDTA, cafeína, albumina, bilirrubina conjugada e bilirrubina não conjugada foram testados como componentes endógenos. Nenhuma interferência foi encontrada ao aplicar o qPCR como aplicação a jusante. Além disso, não foram observadas interferências derivadas dos componentes do QIAamp DSP Circulating NA Kit (proteínase K, Buffer ACL, Buffer ACB, Buffer ACW1, Buffer ACW2 e etanol) durante o processamento de amostras e extração de ácidos nucleicos.

Devido à complexidade das substâncias potencialmente interferentes e das diferentes sensibilidades das aplicações específicas a jusante, recomendamos que os usuários avaliem o efeito de substâncias interferentes específicas em seus fluxos de trabalho e validem um método para controlar as interferências nas aplicações de diagnóstico específicas a jusante.

Para obter mais informações sobre substâncias interferentes em aplicações específicas QIAGEN a jusante, consulte os manuais dos kits relevantes.

## Contaminação cruzada

Para avaliar o nível de contaminação cruzada, 105 cópias do vírus HBV foram adicionadas a 5 ou 2 ml de plasma sanguíneo humano (amostras positivas) e foram isoladas adjacentes a amostras livres de vírus (amostras negativas) em uma configuração quadriculada alternando com execuções de extração contendo somente amostras negativas (para avaliar a contaminação cruzada de execuções intra e interextrações). O estudo teve como objetivo reproduzir a situação em que pode ocorrer contaminação cruzada entre amostras contendo um elevado nível de moléculas-alvo de ácido nucleico e outras amostras durante o processo de extração. A purificação de NAs foi realizada usando um lote de reagentes. A contaminação cruzada foi avaliada com o *artus*<sup>®</sup> HBV RG CE PCR Kit. Os resultados demonstraram a inexistência de contaminação cruzada em todo o sistema.

## Símbolos



Este produto atende aos requisitos do Regulamento Europeu 2017/746 para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.



Dispositivo médico de diagnóstico in vitro



Número de referência



Fabricante

Rn

R representa a revisão das Instruções de Uso (características de desempenho) e n representa o número de revisão

# Histórico de revisões do documento

Revisão	Descrição
R1, junho de 2022	Atualização para a versão 2 do QIAamp DSP Circulating Kit em conformidade com o IVDR  Adição de isolamento "manual" no uso pretendido. Sem alterações nos dados de Desempenho em comparação com a versão 1 do kit.

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

Marcas: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, artus®, GeneRead®, GeneReader® (QIAGEN Group); Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); PAXgene® (PreAnalytiX GmbH); Streck®, Cell-Free DNA BCT® (Streck Inc.); Qubit® (Thermo Fisher Scientific ou as suas subsidiárias). Os nomes registrados, as marcas registradas etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcados especificamente como tal, devem ser considerados protegidos pela lei.  
06/2022 HB-3049-D01-001 © 2022 QIAGEN. Todos os direitos reservados.

