

# Características de desempenho do RNeasy<sup>®</sup> DSP FFPE Kit

Versão 2



Para uso em diagnóstico in vitro

Para uso com o RNeasy DSP FFPE Kit



73604



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 RNeasy DSP FFPE Kit destina-se à purificação manual de RNA total de tecidos fixados em formalina e conservados em parafina (Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE).

O produto deve ser usado por usuários profissionais, como técnicos e médicos, especializados em técnicas biológicas moleculares. Faz uso de um protocolo otimizado baseado em coluna giratória de sílica e inclui remoção enzimática de DNA residual.

O RNeasy DSP FFPE Kit isola moléculas de RNA com mais de 70 nucleotídeos e permite a recuperação de fragmentos de RNA utilizáveis para aplicações a jusante, como RT-PCR.

## Rendimento de RNA purificado

O desempenho básico do RNeasy DSP FFPE Kit foi avaliado usando amostras FFPE de 5 tecidos humanos diferentes (mama, cólon, pulmão, melanoma e pele normal; 20 amostras de cada).

As amostras FFPE podem apresentar um alto grau de heterogeneidade de tecidos. Além disso, a área de superfície dos tecidos é altamente variável em amostras FFPE, fazendo variar a quantidade de RNA extraído. Portanto, o usuário deve otimizar o número de seções, a espessura das seções e a área de superfície das seções em função da sua amostra de interesse e de quaisquer procedimentos a jusante utilizados em seu laboratório.

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

Uma desidratação insuficiente dos tecidos durante a preparação de tecido FFPE, adicionar demasiada parafina à amostra no tubo de extração, usar etanol com menor pureza (de qualidade não adequada para biologia molecular) do que a recomendada ou reter o etanol na amostra pode reduzir a qualidade da extração e a quantidade de RNA ou reduzir o desempenho a jusante.

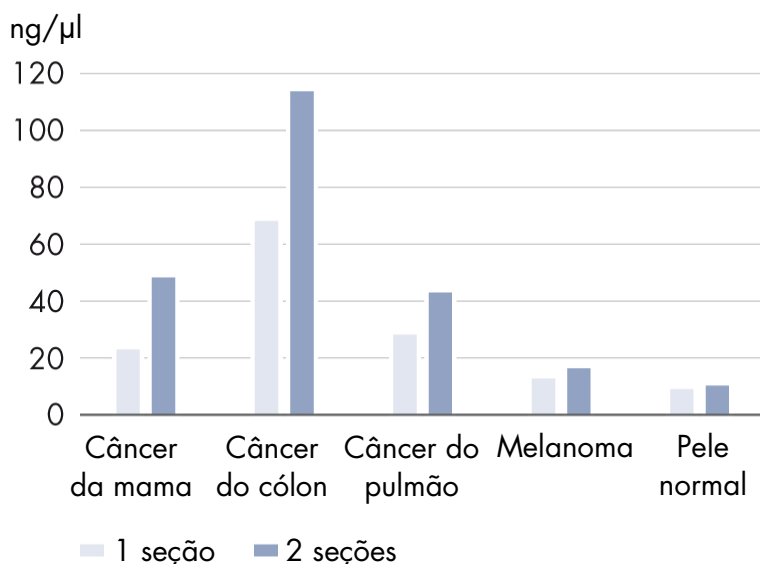


Figura 1. Rendimentos de RNA de diferentes tecidos humanos (32 μl de volume de eluição).

## Análise a jusante

O RNA eluído está pronto a ser usado em ensaios posteriores. Para avaliar o desempenho, foram isolados 10 ng de RNA com o RNeasy DSP FFPE Kit de 5 tecidos humanos diferentes (mama, cólon, pulmão, melanoma e pele normal; 20 amostras incluindo uma ou duas seções) e validados usando RT-PCR focalizado para o gene  $\beta$ -actina humano. A amplificação foi bem-sucedida, mostrando que o RNA isolado com o RNeasy DSP FFPE Kit pode ser usado para análise a jusante.

O usuário deve otimizar o número de seções, a espessura das seções e a área de superfície das seções em função da sua amostra de interesse e de quaisquer procedimentos subsequentes usados em seu laboratório ou consultar o desempenho específico do ensaio posterior relevante.

	<b>Câncer da mama</b>	<b>Câncer do cólon</b>	<b>Câncer do pulmão</b>	<b>Melanoma</b>	<b>Pele normal</b>
RT-PCR 1 seção	✓	✓	✓	✓	✓
RT-PCR 2 seções	✓	✓	✓	✓	✓

Figura 2. Amplificação por RT-PCR bem-sucedida de 10  $\mu$ m de seções FFPE derivadas de cinco tecidos humanos diferentes testados.

## Estabilidade do eluato

A estabilidade do eluato dependerá do conteúdo e do tipo de impurezas copurificadas (relacionadas ao tipo de tecido), 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 amostras de RNA humano derivadas de FFPE armazenadas entre -15 a -30 °C e -60 a -90 °C. Não foi observada qualquer deterioração até às 12 semanas e os eluatos armazenados à temperatura ambiente (18 a 25 °C) mantiveram-se estáveis até durante 12 horas. Todas as condições foram avaliadas usando RT-PCR focalizado para 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.

## Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada usando amostras FFPE de células sanguíneas humanas nucleadas. As amostras foram testadas com um ensaio validado internamente para um fragmento de 295 bp do gene  $\beta$ -actina humano em um termociclador de real-time PCR ABI® 7900.

Para análise estatística, foram usados 108 pontos de dados de três lotes de extração (o mesmo lote de kits, operador, dia). A análise estatística incluiu o cálculo do desvio padrão (Standard Deviation, SD) e do coeficiente de variação (Coefficient of Variation, CV) dos valores  $C_T$  derivados da RT-PCR da  $\beta$ -actina. O SD foi de 1,1  $C_T$  e o CV de 4,1% (Tabela 1).

**Tabela 1. Resultados de repetibilidade**

	Repetibilidade		
	C <sub>T</sub> médio	SD	CV (%)
Lote 1	26,64	1,01	3,81
Lote 2	27,51	1,16	4,2
Lote 3	27,23	0,95	3,5
Lote 1 + 2 + 3	27,13	1,11	4,07

## Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi determinada avaliando extrações de RNA de amostras FFPE de células sanguíneas humanas nucleadas com operadores diferentes, em dias diferentes e com operadores e dias diferentes. As amostras foram testadas com um ensaio validado internamente para um fragmento de 295 bp do gene  $\beta$ -actina humano em um termociclador de real-time PCR ABI 7900. Para análise estatística, foram usados 108 pontos de dados de três lotes de extração para cada configuração do teste. A análise estatística incluiu o cálculo do SD e do coeficiente de variação (Coefficient of Variation, CV) dos valores de C<sub>T</sub> derivados da RT-PCR da  $\beta$ -actina (Tabela 2).

**Tabela 2. Resultados de reprodutibilidade**

	Repetibilidade		
	C <sub>T</sub> médio	SD	CV (%)
Operadores diferentes	26,92	1,06	3,95
Dias diferentes	26,56	1,20	4,53
Operadores e dias diferentes	26,63	1,01	3,78

## Linearidade da entrada de amostra

O RNeasy DSP FFPE Kit pode ser usado para isolar RNA de diferentes tipos de tecido FFPE. O sistema foi validado para o uso de 1 a 4 seções de células sanguíneas humanas nucleadas FFPE e demonstrou um aumento linear em termos de rendimento de RNA. Deve ser estabelecido um intervalo linear em função dos requisitos de cada cliente, o qual deve também ser validado em função do seu uso específico. São expectáveis intervalos lineares diferentes para tipos de tecido diferentes, dependendo da carga de tecido no sistema, das características do tecido e dos ensaios posteriores.

## Substâncias interferentes

Podem surgir substâncias potencialmente interferentes de diferentes origens, por ex., metabólitos naturais específicos do tipo de tecido e de órgão, metabólitos produzidos durante condições patológicas, substâncias introduzidas durante o tratamento do paciente ou substâncias ingeridas pelo paciente. Devido à complexidade das substâncias potencialmente interferentes e das diferentes sensibilidades das aplicações específicas a jusante, recomendamos que os usuários avaliem o efeito das substâncias interferentes nos seus sistemas e validem um método para controlar as interferências nas suas aplicações de diagnóstico específicas a jusante.

Durante o processamento de amostras e a extração de RNA, não foram observadas substâncias interferentes derivadas de componentes do RNeasy DSP FFPE Kit.



















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

## Contaminação cruzada

Para avaliar o nível de contaminação cruzada, foram misturados na solução de desparafinização e isolados 500 ng de RNA total de sangue, ao lado de tubos que não continham RNA (tubos de extração negativa). O estudo teve como objetivo reproduzir a situação na qual pode ocorrer contaminação cruzada entre amostras contendo um elevado nível de moléculas-alvo de RNA e outras amostras durante o processo de extração. A purificação de RNA foi realizada usando um lote de reagentes. A contaminação cruzada foi avaliada usando RT-PCR focalizado no gene  $\beta$ -actina humano. Os resultados demonstraram a inexistência de contaminação cruzada em todo o sistema.

# Símbolos

Os seguintes símbolos são exibidos nas instruções de uso ou na embalagem e no rótulo:

Símbolo	Definição do símbolo
	Contém reagentes suficientes para <N> reações
	Data de validade
	Este produto atende aos requisitos do Regulamento Europeu 2017/746 para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Na chegada
	DN
	RNeasy MinElute Spin
	Número de referência
	Número de lote
	Número do material (isto é, etiquetagem do componente)
	Componentes (isto é, uma lista do que está incluso)
	Contém (conteúdo)
	Número (isto é, frascos, recipientes)
	Número global de item comercial
Rn	R representa a revisão das Instruções de Uso (Manual) e n representa o número de revisão
	Limites de temperatura
	Fabricante
	Consulte as instruções de uso
	Cuidado

Símbolo

Definição do símbolo

**PROTK**

Proteinase K

Sodium azide

Azida de sódio

**UDI**

Identificador único do dispositivo

# Histórico de revisões do documento

Revisão	Descrição
R1, junho de 2022	Publicação IVDR

Para obter informações de licenciamento atualizadas e isenções de responsabilidade específicas do produto, consulte o manual do usuário ou o manual do kit QIAGEN respectivo. 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 registradas: QIAGEN®, Sample to Insight®, RNeasy® (QIAGEN Group); ABI® (Life Technologies Corporation). Os nomes registrados, marcas registradas etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcados especificamente como tal, devem ser considerados protegidos pela lei.

06/2022 HB-3027-D01-001 © 2022 QIAGEN, todos os direitos reservados.



