

Instruções de uso (características de desempenho) do QIASymphony[®] DSP Circulating DNA Kit

Versão 2



Para uso em diagnóstico in vitro

Para uso com o QIASymphony DSP Circulating DNA Kit



REF

937556



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Alemanha

R1

As características de desempenho estão disponíveis eletronicamente e na guia de recursos da página de produto em www.qiagen.com.

Introdução geral

O sistema QIASymphony DSP Circulating DNA é um sistema in vitro pronto para uso para a purificação qualitativa de DNA livre circulante (ccfDNA) do plasma humano e urina humana.

O QIASymphony DSP Circulating DNA Kit destina-se ao uso somente em conjunto com o instrumento QIASymphony SP.

O QIASymphony DSP Circulating DNA Kit fornece reagentes para a purificação totalmente automatizada e simultânea de ccfDNA a partir de uma ampla gama de tipos de plasma humano (com estabilizadores de perfil ccfDNA, por ex., Cell-Free DNA BCT® de Streck®, assim como sem estabilizadores de perfil ccfDNA, por ex., tubos com EDTA) e urina humana (com e sem estabilizadores de perfil ccfDNA). Contudo, não foi estabelecida uma característica de desempenho para cada tubo de coleta de sangue e o usuário deve validá-la.

O ccfDNA purificado é compatível com uma grande variedade de aplicações a jusante, como químicos de PCR, teste de quantificação baseado em fluorescência ou NGS.

O QIASymphony SP executa todas as etapas do processo de purificação. Em uma única execução, são processadas até 96 amostras em lotes de 24. As amostras de urina podem exigir pré-tratamento manual de amostra.

Nota: As características de desempenho dependem altamente de vários fatores e está relacionada à aplicação a jusante específica. Elas foram estabelecidas para o QS DSP Circulating DNA Kit em conjunto com as aplicações a jusante exemplares. Contudo, os métodos para isolar ácidos nucleicos de espécimes biológicas são usados como um front-end para diversas aplicações a jusante, por exemplo, a contaminação cruzada e a precisão da execução precisam ser estabelecidas para qualquer fluxo de trabalho como parte do desenvolvimento da aplicação a jusante. Portanto, o usuário é responsável por validar todo o fluxo de trabalho para estabelecer os parâmetros de desempenho adequados.

Desempenho básico

O desempenho básico do QIASymphony DSP Circulating DNA Kit foi avaliado utilizando 48 doadores individuais para a extração de ccfDNA de 4 ml de plasma Streck, bem como 4 ml de urina estabilizada. O rendimento de ccfDNA foi determinado com um ensaio de real-time PCR feito internamente para a sequência codificadora do RNA ribossomal 18S.

A diferença entre os rendimentos (\log_{10} cópias/ml) na Figura 1 (4 ml de plasma) e na Figura 2 (4 ml de urina) reflete as fortes concentrações de ccfDNA dependentes de doadores tipicamente encontradas no mesmo volume do respectivo material de amostra.

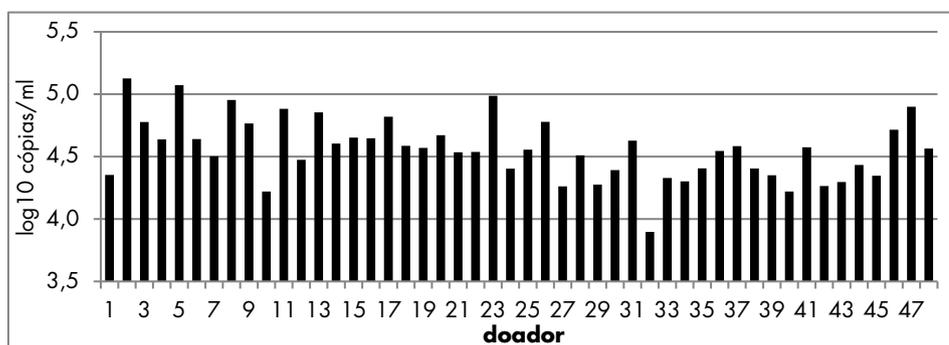


Figura 1. Rendimento de ccfDNA do plasma de 48 doadores individuais. A doação de sangue de 48 doadores individuais foi feita em Cell-Free DNA BCT (Streck). O CcfDNA foi extraído de 4 ml de plasma utilizando o QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. O rendimento de ccfDNA foi quantificado utilizando um teste de real-time PCR feito internamente para a sequência codificadora 18S. Os resultados foram calculados como cópias-alvo por mililitro de inserção de plasma.

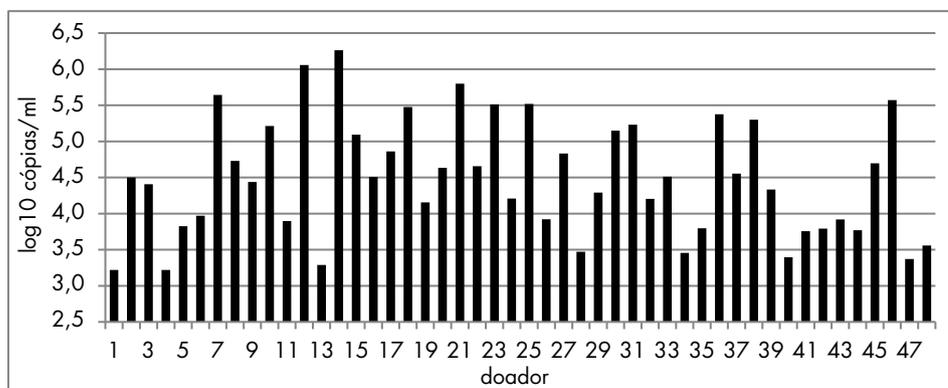


Figura 2. Rendimento de cfDNA da urina de 48 doadores individuais. A urina coletada de 48 doadores individuais foi estabilizada utilizando Cell-Free DNA Urine Preserve® (Streck). O cfDNA foi extraído de 4 ml de urina utilizando o QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. O rendimento de cfDNA foi quantificado utilizando um teste de real-time PCR feito internamente para a sequência codificadora 18S. Os resultados foram calculados como cópias-alvo por mililitro de inserção de urina.

Precisão da execução

Os coeficientes de variação (CVs) foram determinados para a extração do cfDNA humano a partir do plasma com EDTA. Para fins de precisão da análise, o cfDNA foi quantificado utilizando um teste de real-time PCR feito internamente para a sequência codificadora 18S ribossomal. No total, foram realizadas 10 execuções do QIASymphony em 4 lotes (8 réplicas por lote). Os dados de precisão são exibidos na Tabela 1.

Tabela 1. Análise das estimativas de precisão

Precisão	CV (%)
Dentro do lote	11,67
Repetibilidade	13,14
Precisão intermediária	13,14
Precisão total	14,12

Desempenho equivalente de protocolos de 2 e 4 ml

O desempenho equivalente de protocolos para inserção de amostra de 2 e 4 ml foi avaliado para o QIASymphony DSP Circulating DNA Kit utilizando cfDNA endógeno extraído de um pool de plasma humano com EDTA. No total, foram realizadas 8 execuções independentes de QIASymphony em 4 lotes com 8 réplicas por lote. A faixa linear do procedimento do QIASymphony DSP Circulating DNA Kit foi determinada para a sequência codificadora 18S com um ensaio de real-time PCR feito internamente (Figura 3). A taxa de diferença dos protocolos de 2 e 4 ml é exibida na Tabela 2 (o protocolo de referência é a inserção de amostra de 4 ml).

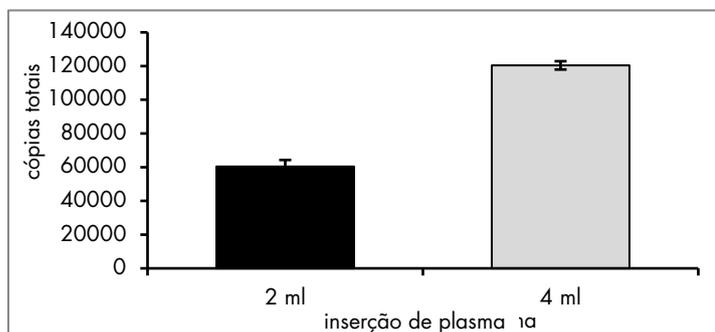


Figura 3. Desempenho equivalente utilizando o protocolo de inserção de amostra de 2 e 4 ml. A faixa linear do protocolo de cfDNA foi determinada utilizando os protocolos de 2 e 4 ml. O rendimento de cfDNA foi quantificado utilizando um ensaio de real-time PCR feito internamente para a sequência codificadora 18S. Os resultados foram calculados como cópias totais por protocolo.

Tabela 2. Diferença entre os protocolos de 2 e 4 ml (N = 256)

Parâmetro	Valor
Taxa estimada da média geométrica em cópias/ml calculada	1,01
Limite de confiança de 95% inferior	0,92
Limite de confiança de 95% superior	1,11
Precisão total	14,12

O desempenho dos protocolos de inserção de amostra de 2 e 4 ml é equivalente, medido em cópias por mililitros calculadas.

Distribuição de tamanho

Para avaliar a distribuição de tamanho da saída de amostra, extraiu-se o ccfDNA de uma inserção de amostra de 4 ml utilizando o QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit, eluído em 75 µl e, em seguida, 1 µl de eluato foi submetido à análise de tamanho com o Agilent® 2100 Bioanalyzer utilizando um Agilent High Sensitivity DNA Chip. Foi realizado um total de 5 réplicas independentes. Um perfil de DNA representativo é exibido para o plasma na Figura 4 e para a urina na Figura 5.

O electroferograma do plasma na Figura 4 mostra o pico frequentemente observado a aproximadamente 165 bp, variando de 145 a 196 bp, o que fica na faixa do comprimento do DNA ligado à histona no nucleossomo. O electroferograma da urina na Figura 5 mostra que o pico predominante a aproximadamente 160 bp é mais amplo, variando de aproximadamente 145 a 250 bp. Além disso, para a urina há um segundo pico que varia de aproximadamente 20 a 100 bp (no nível do pico do marcador inferior) indicando um segmento de ccfDNA com um grau de fragmentação mais elevado. Adicionalmente, a Figura 5 mostra um número elevado de fragmentos longos de DNA de aproximadamente 2 kb. A abundância elevada desses fragmentos de DNA genômico é frequentemente encontrada na amostra de urina provavelmente devido à liberação de DNA genômico das células presentes na urina.

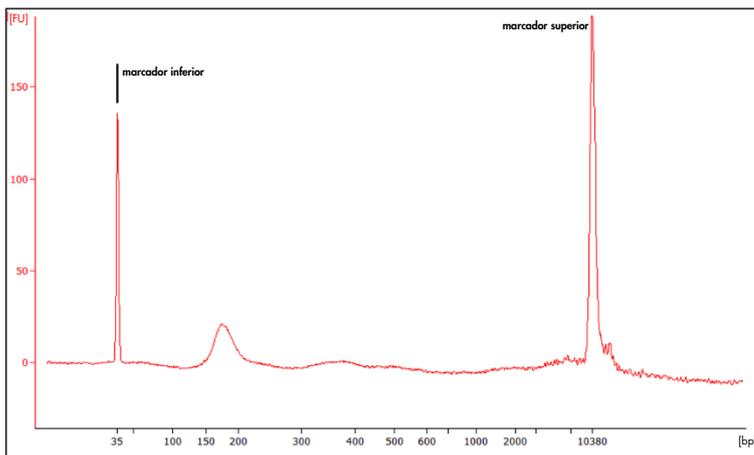


Figura 4. Distribuição de tamanho do ccfDNA do plasma (perfil Bioanalyzer). O ccfDNA foi extraído de 4 ml de plasma com EDTA utilizando o QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit; 1 µl de eluato foi submetido a uma análise com o Agilent High Sensitivity DNA Chip. Eixo x: tamanho do par de base (bp); Eixo y: unidades de fluorescência (FU).

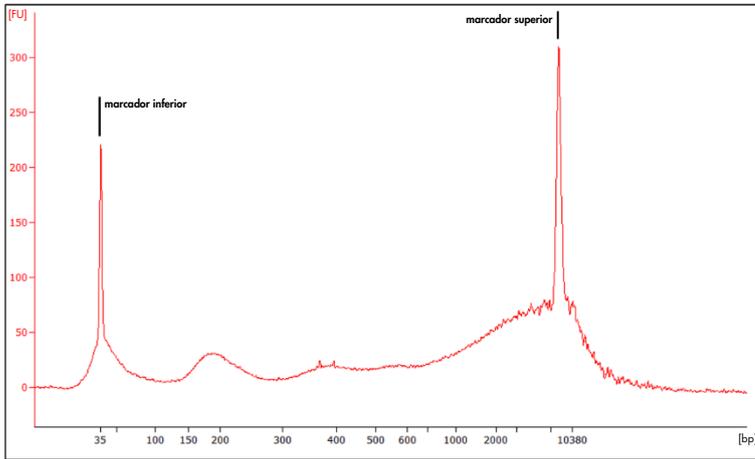


Figura 5. Distribuição de tamanho do ccfDNA da urina (perfil Bioanalyzer). O ccfDNA foi extraído de 4 ml de urina utilizando o QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit; 1 µl de eluato foi submetido a uma análise com o Agilent High Sensitivity DNA Chip. Eixo x: tamanho do par de base (bp); Eixo y: unidades de fluorescência (FU).

Estabilidade do eluato

A estabilidade do eluato para o QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit foi avaliada, utilizando o ccfDNA extraído de um pool de plasma humano com EDTA. Os eluatos foram armazenados em 2 formatos diferentes de rack de eluição: QIAGEN® EMTR (Elution Microtubes CL 96; n° de ref. 19588) e tubos de 1,5 ml de Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock. Os eluatos foram analisados em réplicas de 8. A estabilidade do DNA em eluatos foi determinada com um teste de real-time PCR feito internamente para a sequência codificadora do RNA ribossomal 18S.

A estabilidade do eluato a 2–8 °C não foi afetada pela duração do período de armazenamento de até um mês nem pelo formato do armazenamento (Figure 6). A estabilidade do DNA nos tubos LoBind não foi afetada pelo armazenamento de -15 °C a -30 °C que inclui 3 ciclos de congelamento-descongelamento após 7 dias, um mês e dois meses (Figure 7).

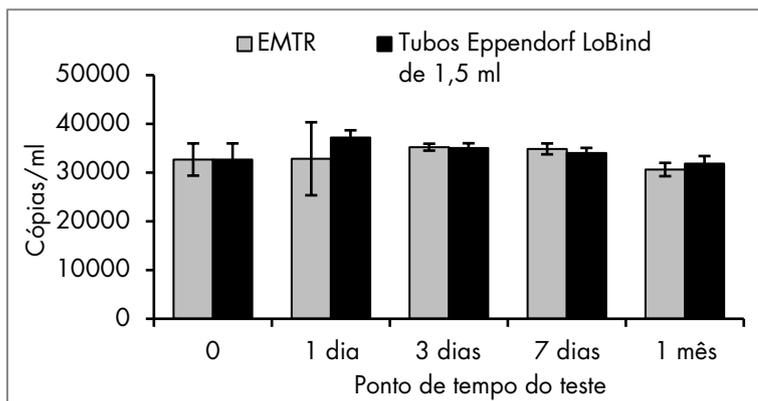


Figura 6. Estabilidade do ccfDNA nos eluatos armazenados a 2–8 °C em 2 formatos de tubo. O ccfDNA foi extraído de plasma com EDTA utilizando o QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit e foi armazenado a 2–8 °C em diferentes pontos de tempo do teste. O rendimento de ccfDNA foi quantificado utilizando um ensaio de real-time PCR feito internamente para a sequência codificadora 18S. Os resultados foram calculados como cópias-alvo por mililitro de inserção de plasma.

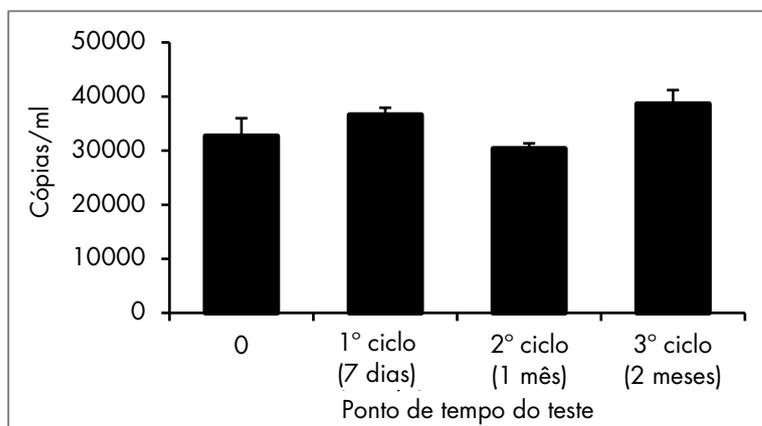


Figura 7. Estabilidade do ccfDNA nos eluatos armazenados de -15 °C a -30 °C incluindo 3 ciclos de congelamento-descongelamento. O ccfDNA foi extraído de plasma com EDTA utilizando o QIASymphony DSP Circulating DNA Kit e foi armazenado de -15 °C a -30 °C em tubos Eppendorf LoBind de 1,5 ml. O rendimento de ccfDNA foi determinado em 3 pontos de tempo do teste utilizando o mesmo eluato em 3 ciclos de congelamento-descongelamento. O rendimento de ccfDNA foi quantificado utilizando um ensaio de real-time PCR feito internamente para a sequência codificadora 18S. Os resultados foram calculados como cópias-alvo por mililitro de inserção de plasma.

Substâncias interferentes

O plasma humano e a urina humana foram contaminados com diferentes substâncias potencialmente interferentes (consulte a Tabela 3) para testar seu impacto no desempenho da extração de ccfDNA do QS DSP Circulating DNA Kit e compatibilidade subsequente com ensaios exemplares a jusante. Os eluatos foram analisados com um teste de real-time PCR feito internamente para a sequência codificadora 18S e com o Qubit® Fluorometer usando um ensaio de dsDNA de alta sensibilidade.

Tabela 3. Concentração de teste de substâncias potencialmente interferentes

Substâncias interferentes	Plasma	Urina
Bilirrubina	200 mg/litro*	200 mg/litro*
Hemoglobina	2 g/litro ¹	-
BSA e gamaglobulina	Até 120 g/litro*	1 g/litro [†]
Triglicérides	5 g/litro*	-
Glicose	10 g/litro*	10 g/litro*
Sangue	-	1% [†]
pH	-	pH 4 e pH 9 [†]

* CLSI EP7-A2 Vol. 25 n° 27

[†] Guia de rascunho FDA (11.05.2011)

Nenhuma das substâncias listadas na Tabela 3 são interferentes, exceto as amostras de plasma com concentrações altas de gamaglobulina (>30 g/litro) podem reduzir a recuperação do DNA livre circulante.

Nota: O teste foi realizado usando aplicações a jusante exemplares para uma avaliação da qualidade dos ácidos nucleicos extraídos. Contudo, diferentes aplicações a jusante podem ter diferentes requisitos em relação a pureza (por ex., a ausência de substâncias potencialmente interferentes), portanto, a identificação e os testes de substâncias relevantes também precisam ser estabelecidas como parte do desenvolvimento da aplicação a jusante para qualquer fluxo de trabalho envolvendo o QIASymphony DSP Circulating DNA Kit.

Contaminação cruzada

O risco de contaminação cruzada do sistema QIAasymphony DSP Circulating DNA foi analisado realizando três execuções de 96 amostras no instrumento QIAasymphony SP com lotes quadriculados alternados (amostras positivas e negativas alternadas). Um plasma feminino (amostra negativa) e um plasma feminino contaminado com gDNA masculino cortado de uma concentração de $1,0E+05$ cópias de gene SRY1 por milímetro de plasma (amostra positiva) foram usados como materiais de amostra para um sistema modelo. O preparo de amostras foi realizado usando o protocolo de 4 ml que inclui duas transferências de amostras separadas de cada volume de 2 ml. Uma potencial contaminação das amostras negativas de plasma feminino durante as execuções de extração foi avaliada por análise subsequente dos eluatos usando um real-time PCR para o gene específico de SRY1 do cromossomo Y.

Nenhuma contaminação cruzada foi detectada para um carryover de amostra para amostra, lote para lote ou execução para execução.

Compatibilidade com diferentes aplicações a jusante

As aplicações a jusante exemplares foram utilizadas durante o desenvolvimento do QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit para demonstrar que os ácidos nucleicos isolados são compatíveis com uma grande variedade de diferentes tecnologias de aplicação a jusante, incluindo real-time PCR (consulte a Figura 1, Figura 2, Figura 3, Figura 6, e Figura 7), Fluorômetro Qubit (ensaio de proteína e ensaio de dsDNA de alta sensibilidade), Biblioteca (consulte a Figura 8) e Sequenciamento de próxima geração (NGS).

O electroferograma na Figura 8 mostra um exemplo de ligação do adaptador e amplificação subsequente bem-sucedidas do ccfDNA. O pico dinucleosomal de aproximadamente 470 bp está visível ao lado do pico proeminente de 300 bp para o ccfDNA nucleosomal (aproximadamente 165 mais aproximadamente 70 bp para cada adaptador).

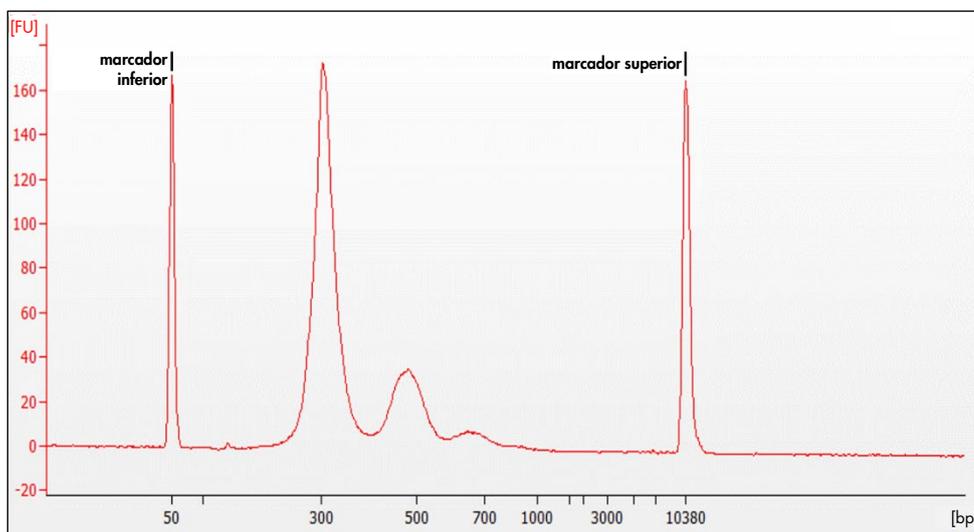
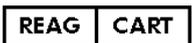
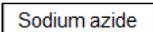


Figura 8. Biblioteca de DNA de ccfDNA (doador individual) extraída com o QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit. O ccfDNA foi extraído do plasma Streck usando o protocolo de 4 ml e, subsequentemente, 35 µl de eluato foi transferido para o NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit (Biolabs). Após a amplificação e limpeza do AMPure XP, 1 µl de eluato foi analisado com o Agilent 7500 DNA Kit.

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 (UE) 2017/746 para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Número de referência
	Número de lote
	Número do material (isto é, etiquetagem do componente)
	Componentes
	Contém
	Número
	Número global de item comercial
Rn	R representa a revisão das Instruções de uso e n representa o número de revisão
	Limites de temperatura
	Fabricante
	Consulte as instruções de uso
	Aviso/cuidado
	Proteinase K
	Número de poços (isto é, poço do cartucho de reagentes)
	Cartucho de reagentes
	Azida de sódio

Símbolo

Definição do símbolo

EtOH

Etanol

UDI

Identificador único do dispositivo

Histórico de revisões

Revisão	Descrição
R1, junho de 2022	Versão 2, Revisão 1 <ul style="list-style-type: none">• Atualização para a versão 2 para conformidade com o IVDR• Seção para substâncias interferentes, contaminação cruzada e compatibilidade com aplicações a jusante adicionada

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 ou podem ser solicitados à Assistência Técnica da QIAGEN ou ao seu distribuidor local.

Marcas registradas: QIAGEN®, Sample to Insight®(QIAGEN Group); Cell-Free DNA Urine Preserve®, Cell-Free DNA BCT®, Streck® (Streck); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); Eppendorf®, LoBind® (Eppendorf AG); NEBNext® (New England Biolabs, Inc.); Qubit® (Thermo Fisher Scientific ou suas subsidiárias). Os nomes registrados, as marcas etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcados especificamente como tal, devem ser considerados protegidos pela lei.

HB-3034-D01-001 © 2022 QIAGEN, todos os direitos reservados.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente

