



Junho de 2022

# Instruções de uso (Características de desempenho) do QIASymphony® DSP DNA Kit

Versão 2

**IVD**

Para uso em diagnóstico in vitro

Para uso com o QIASymphony DSP DNA Mini Kit e o QIASymphony DSP DNA Midi Kit



**REF**

937236, 937255



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

Os QIASymphony DSP DNA Kits destinam-se ao uso somente em conjunto com o QIASymphony SP.

Os QIASymphony DSP DNA Mini Kits fornecem reagentes para a purificação automatizada de DNA total de sangue total humano, camada leucoplaquetária, amostras de tecido e de tecido fixado em formalina e conservado em parafina (FFPE), bem como DNA viral de sangue total humano. Os QIASymphony DSP DNA Midi Kits fornecem reagentes para a purificação automatizada de DNA total de sangue total humano e de camada leucoplaquetária. Contudo, não foram estabelecidas características de desempenho para tubo de coleta de sangue ou tipo de tecido, sendo que as mesmas devem ser validadas pelo usuário.

A tecnologia de partículas magnéticas permite a purificação de ácidos nucleicos de alta qualidade isentos de proteínas, nucleases e outras impurezas. Os ácidos nucleicos purificados estão prontos para serem usados diretamente em aplicações a jusante, como reações em amplificação (PCR). O QIASymphony SP executa todas as etapas do processo de purificação. Em uma única execução, são processadas até 96 amostras em lotes de até 24.

A seguir, exibem-se os dados de desempenho selecionados para diferentes aplicações.

# Características de desempenho

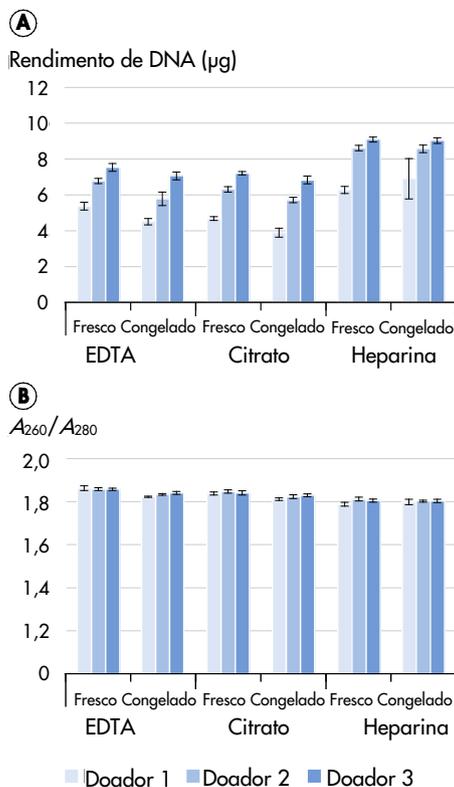
Nota: As características de desempenho dependem muito de vários fatores e estão relacionadas à aplicação a jusante específica. Elas foram estabelecidas para os QIAasymphony DSP DNA Mini e Midi Kits em conjunto com as aplicações a jusante exemplares. Contudo, os métodos para isolar ácidos nucleicos de espécimes biológicas são usados como um front-end para diversas aplicações a jusante. Os parâmetros de desempenho, tais como contaminação cruzada ou precisão de execução, precisam ser estabelecidos 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 de modo a estabelecer os parâmetros de desempenho adequados.

## Desempenho básico e compatibilidade para diferentes aplicações a jusante

### Sangue de DNA e camada leucoplaquetária

#### Rendimento de DNA

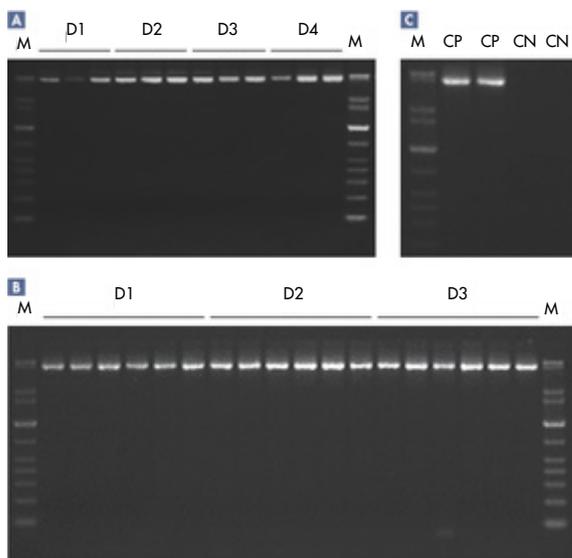
O desempenho básico do QIAasymphony DSP DNA Mini Kit foi avaliado usando diferentes anticoagulantes e tubos de coleta, bem como sangue total humano fresco e congelado. O sangue total foi coletado a partir de três doadores saudáveis (contagem de glóbulos brancos [GB]  $4,0$  a  $11,0 \times 10^6$  células/ml) em três tipos diferentes de tubos: EDTA, 10 ml BD™ Vacutainer® 16 x 100 mm (K2-EDTA); citrato, Tubo 9NC de 13 x 75 mm (citrato), 2,7 ml Sarstedt® S-Monovette®; heparina, 7,5 ml Sarstedt S-Monovette 15 x 92 mm (heparina de lítio). O sangue foi usado fresco (armazenado a  $2-8$  °C) ou congelado (armazenado a  $-20$  °C). O DNA genômico foi purificado a partir de amostras de 200 µl, com 4 réplicas por doador e por tipo de tubo, usando o QIAasymphony DSP DNA Mini Kit e o protocolo de sangue 200 DSP com um volume de eluição de 200 µl. Os rendimentos e a pureza do DNA foram determinados por análise espectroscópica (Figura 1).



**Figura 1. Rendimento e pureza do DNA usando diferentes tubos de coleta de amostras e anticoagulantes com sangue total humano fresco e congelado. A** Rendimento de DNA, as barras mostram o rendimento absoluto de DNA com o desvio padrão. **B** Pureza de DNA, as barras mostram a pureza de DNA com o desvio padrão.

## Integridade de DNA

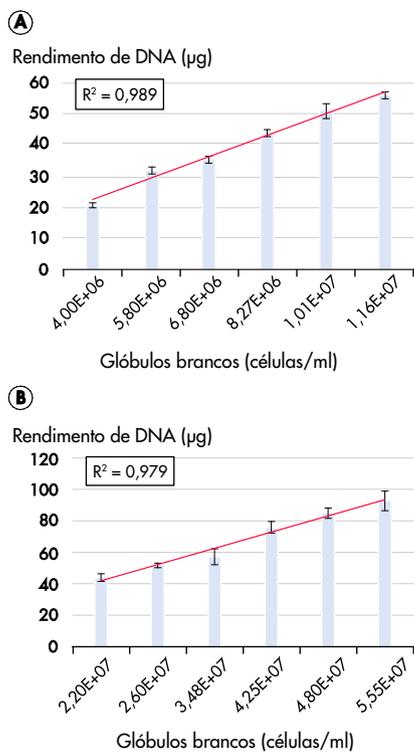
Os produtos de PCR de longo alcance (5 kb) foram amplificados usando o ensaio de PCR LongRange (Figura 2)



**Figura 2. Integridade de DNA testada por meio de PCR de longo alcance.** M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder. **A** O sangue total foi coletado a partir de 4 doadores saudáveis (D) em tubos BD K2E. O DNA genômico para PCR de longo alcance foi purificado a partir de alíquotas de 200 µl em triplicado usando o QIASymphony DSP DNA Mini Kit e o protocolo de sangue 200 DSP com um volume de eluição de 200 µl. D1, doador 1; D2, doador 2; D3, doador 3; e D4, doador 4. **B** O sangue total foi coletado a partir de 3 doadores saudáveis em tubos BD K2E e a camada leucoplaquetária foi preparada. O DNA genômico foi purificado a partir de alíquotas de 200 µl em seis réplicas usando o QIASymphony DSP DNA Mini Kit e o protocolo de camada leucoplaquetária 200 DSP com um volume de eluição de 200 µl. D1, doador 1; D2, doador 2 e D3, doador 3. **C** Controles: CP, controle positivo; e CN, controle negativo.

## Correlação do rendimento de DNA com a contagem de glóbulos brancos

O desempenho para as aplicações QIASymphony DSP DNA Blood e Buffy Coat foi avaliado usando amostras de sangue e de camada leucoplaquetária com seis contagens de glóbulos brancos diferentes para cada tipo de amostra. Para sangue total, as contagens de glóbulos brancos variaram entre  $4 \times 10^6$  células/ml e  $11,6 \times 10^6$  células/ml e, para a camada leucoplaquetária, as contagens variaram entre  $2,2 \times 10^7$  células/ml e  $5,6 \times 10^7$  células/ml. Os rendimentos de DNA foram determinados por meio de análise espectroscópica e comparados com a contagem de glóbulos brancos (Figura 3).



**Figura 3. Correlação do rendimento de DNA com a contagem de glóbulos brancos.** **A** O DNA genômico foi purificado a partir de 1 ml de sangue total humano usando o QIASymphony DSP DNA Midi Kit e o protocolo de sangue 1000 DSP com um volume de eluição de 500 µl. As barras mostram o rendimento absoluto de DNA com o desvio padrão. **B** O DNA genômico foi purificado a partir de 400 µl de camada leucoplaquetária usando o QIASymphony DSP DNA Midi Kit e o protocolo de camada leucoplaquetária 400 DSP com um volume de eluição de 400 µl. As barras mostram o rendimento absoluto de DNA com o desvio padrão.

## Sangue com vírus

Os estudos de taxa de acerto foram realizados por meio da diluição do material padrão CMV da OMS pré-quantificado no sangue total humano negativo para CMV. Foi observada uma taxa de detecção de 100% para amostras com cargas virais de 90 UI de CMV por mililitro (Tabela 1).

Tabela 1. Sensibilidade da aplicação QIASymphony DSP Virus Blood

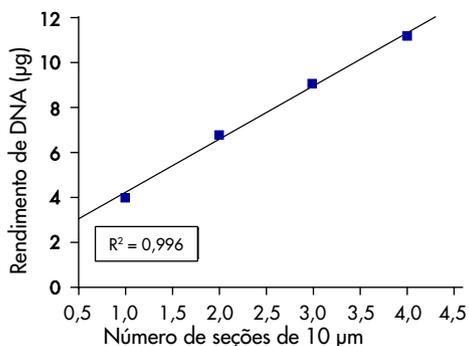
CMV (UI/ml)	Réplicas	Acertos	Acerto (%)
350	18	18	100,00
230	32	32	100,00
115	31	31	100,00
90	32	32	100,00
60	30	24	80,00
30	30	15	50,00
15	30	10	33,33
6	21	5	23,81
2	21	2	9,52
0	15	0	0,00

O sangue total humano foi coletado a partir de 1 doador saudável com CMV negativo em tubos BD K2E e fortificado com material padrão CMV da OMS usando diferentes títulos. O DNA viral foi purificado usando o QIASymphony DSP DNA Mini Kit e o protocolo de sangue com vírus 200 DSP, com um volume de eluição de 60 µl. Os eluatos foram analisados com um ensaio real-time PCR para CMV.

## Tecido e tecido FFPE

### Rendimento de DNA

O desempenho para a aplicação de tecido FFPE do QIAAsymphony DSP DNA foi avaliado usando seis réplicas de 1–4 seções de FFPE de 10 µm de baço humano recém-cortado. A extração de DNA foi realizada usando o QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit em conjunto com o protocolo DSP de baixo conteúdo de tecido. A desparafinização e a lise foram realizadas usando o método de pré-tratamento com xileno/etanol. O DNA foi eluído em 50 µl de tampão de eluição e o rendimento de DNA foi determinado por meio de análise espectroscópica (Figura 4).



**Figura 4. Correlação do rendimento de DNA com o número de seções de tecido FFPE.** Seis réplicas de 1–4 seções de tecido FFPE de 10 µm de baço humano foram desparafinizadas por meio de pré-tratamento com xileno/etanol. A extração de DNA foi realizada no QIAAsymphony SP usando o QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit em conjunto com o protocolo DSP de baixo conteúdo de tecido e um volume de eluição de 50 µl.

### Análise do status mutacional de biomarcadores por PCR em tempo real

A análise do status mutacional de biomarcadores foi realizada usando DNA extraído de seções de FFPE de cólon humano e DNA extraído de amostras de tecido de pulmão humano.

Para a extração de DNA de amostras de tecido FFPE, foram usadas 3 seções de 10 µm de cólon humano para o preparo de amostras. A extração de DNA foi realizada usando Deparaffinization Solution para o pré-tratamento e o protocolo DSP de baixo conteúdo de tecido em conjunto com o volume de eluição de 100 µl. A análise mutacional do biomarcador KRAS foi realizada usando um ensaio real-time PCR para a detecção de KRAS, em conformidade com o manual do ensaio. Os valores de  $C_T$  do ensaio de controle estavam dentro do intervalo definido e a análise de detecção de mutação revelou uma substituição do aminoácido no códon 12, demonstrado pelo valor de  $\Delta C_T$  de 4,17, que se encontra abaixo do valor de cut-off de 8 definido para a detecção de uma mutação 12SER (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados da análise mutacional do biomarcador KRAS de tecido FFPE

Amostra	Reação	C <sub>T</sub> alvo	C <sub>T</sub> de controle interno	ΔC <sub>T</sub> *
Controle sem fita molde	Controle	0,00	32,75	-
	12ALA	0,00	32,65	-
	12ASP	0,00	32,69	-
	12ARG	0,00	32,86	-
	12CYS	0,00	32,35	-
	12SER	0,00	32,76	-
	12VAL	0,00	32,41	-
	13ASP	0,00	32,26	-
Padrão	Controle	25,95	32,73	-
	12ALA	26,39	32,29	0,44
	12ASP	26,54	32,15	0,59
	12ARG	26,35	32,14	0,40
	12CYS	26,31	32,47	0,36
	12SER	26,50	32,34	0,55
	12VAL	25,80	31,92	-0,15
	13ASP	27,09	32,54	1,14
Tecido FFPE (cólón humano)	Controle	24,94	31,98	-
	12ALA	n.d.	32,42	-
	12ASP	n.d.	32,73	-
	12ARG	n.d.	33,05	-
	12CYS	n.d.	32,74	-
	12SER	29,11	32,34	4,17
	12VAL	n.d.	32,81	-
	13ASP	n.d.	33,20	-

\*  $\Delta C_T = M C_T - C C_T$ , no qual M significa mutação e C significa controle; n.d., não detectado.

Para a extração de DNA de amostras de tecido congelado, foram usados 25 mg de tecido de pulmão humano para o preparo de amostras usando o protocolo DSP de alto conteúdo de tecido e um volume de eluição de 200 µl. A análise mutacional do biomarcador EGFR foi realizada usando um ensaio real-time PCR para EGFR. A análise de controle e detecção de mutação foi realizada conforme descrito no manual do ensaio. Os resultados revelaram uma deleção no gene EGFR, conforme demonstrado pelo valor  $\Delta C_T$  de 2,47, que se encontra abaixo do valor de cut-off de 12 definido para a detecção de uma mutação (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados da análise mutacional do biomarcador EGFR de tecido congelado

Amostra	Reação	C <sub>T</sub> alvo	C <sub>T</sub> de controle interno	ΔC <sub>T</sub> *
Controle sem fita molde	Controle	0,00	31,71	-
	T790M	0,00	32,36	-
	Deleções	0,00	31,75	-
	L858R	0,00	32,05	-
	L861Q	0,00	31,77	-
	G719X	0,00	31,68	-
	S768I	0,00	32,25	-
	Ins	0,00	31,84	-
Padrão	Controle	28,78	31,05	-
	T790M	30,08	31,13	1,30
	Deleções	28,23	31,19	-0,55
	L858R	27,58	30,83	-1,20
	L861Q	27,80	30,86	-0,98
	G719X	27,80	30,90	-0,98
	S768I	29,28	31,41	0,50
	Ins	28,00	31,64	-0,78
Tecido (pulmão humano)	Controle	25,76	31,23	-
	T790M	n.d.	31,99	-
	Deleções	28,23	30,99	2,47
	L858R	n.d.	31,33	-
	L861Q	n.d.	31,98	-
	G719X	n.d.	32,06	-
	S768I	n.d.	31,88	-
	Ins	n.d.	31,62	-

\*  $\Delta C_T = M C_T - C C_T$ , no qual M significa mutação e C significa controle; n.d, não detectado.

## Repetibilidade e reprodutibilidade

### Sangue de DNA

A extração de DNA foi realizada usando o protocolo de sangue 200 DSP com um volume de eluição de 200 µl. A repetibilidade foi avaliada por um único operador ao realizar três execuções independentes (com 96 amostras cada) em três dias diferentes, sendo que cada execução consistiu em 4 lotes de 24 amostras (Tabela 4 e Tabela 5).

A reprodutibilidade foi avaliada ao realizar três execuções independentes (com 96 amostras cada) em três dias diferentes, por três operadores diferentes, em diferentes instrumentos QIASymphony SP, sendo que cada execução consistiu em 4 lotes de 24 amostras (Tabela 6 e Tabela 7).

Tabela 4. Resultados da avaliação de repetibilidade

Execução	Lote	n	Rendimento médio de DNA (µg)	DP	CV
1	1	24	5,32	0,22	4,22
	2	24	4,90	0,22	4,54
	3	24	4,95	0,21	4,26
	4	24	5,05	0,18	3,60
2	1	24	5,17	0,30	5,84
	2	24	4,90	0,15	3,14
	3	24	4,82	0,20	4,13
	4	24	4,87	0,17	3,52
3	1	24	5,11	0,17	3,33
	2	24	4,84	0,24	4,91
	3	24	4,87	0,16	3,38
	4	24	4,78	0,16	3,38
Total	-	288	4,96	-	-

n, Número de réplicas; DP, desvio padrão; CV, coeficiente de variação.

Tabela 5. Dados de precisão para a avaliação de repetibilidade

	DP	CV
Lote a lote na mesma execução	0,25	4,95
Precisão de repetição geral	0,26	5,18

DP, desvio padrão; CV, coeficiente de variação.

Tabela 6. Resultados da avaliação de reprodutibilidade

Execução	Lote	n	Rendimento médio de DNA (µg)	DP	CV
1	1	24	5,32	0,22	4,22
	2	24	4,90	0,22	4,54
	3	24	4,95	0,21	4,26
	4	24	5,05	0,18	3,60
2	1	24	5,73	0,22	3,81
	2	24	5,56	0,26	4,63
	3	24	5,40	0,20	3,63
	4	24	5,46	0,21	3,89
3	1	24	5,73	0,26	4,62
	2	24	5,54	0,24	4,40
	3	24	5,41	0,18	3,34
	4	24	5,49	0,17	3,16
Total	-	288	5,38	-	-

n, Número de réplicas; DP, desvio padrão; CV, coeficiente de variação.

Tabela 7. Dados de precisão para a avaliação de reprodutibilidade

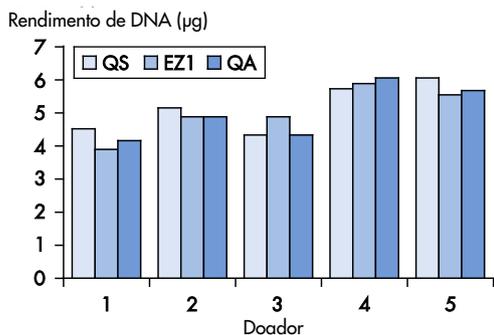
	DP	CV
Lote a lote na mesma execução	0,25	4,73
Precisão de repetição geral	0,38	7,03

DP, desvio padrão; CV, coeficiente de variação.

## Desempenho comparativo

### Sangue de DNA

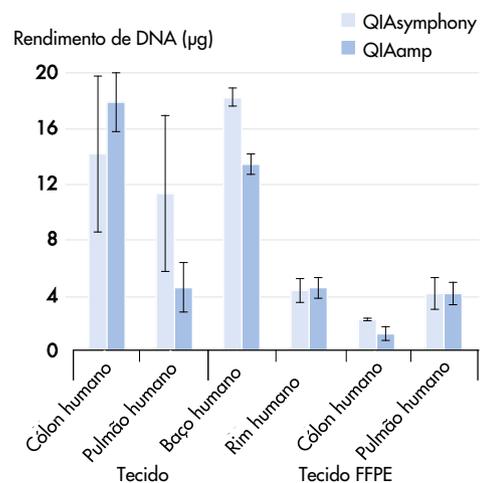
O desempenho foi analisado para o sistema QIAasymphony DSP DNA Blood em comparação com o sistema EZ1® DSP DNA Blood e o procedimento de preparo manual do QIAamp® DNA Blood Mini Kit. O DNA foi purificado a partir de diferentes amostras de sangue, analisado para rendimento de DNA (Figura 5).



**Figura 5. Comparação de rendimentos de DNA entre diferentes sistemas de purificação de DNA do sangue.** O sangue total foi coletado a partir de 5 doadores saudáveis em tubos BD K2E. Para todos os métodos, foram usados volumes de entrada de amostra de 200 µl e volumes de eluição de 200 µl. QS, QIAasymphony DSP DNA Mini Kit e protocolo blood 200 DSP; EZ1, EZ1 Advanced XL usando o EZ1 DSP DNA Blood Kit; QA, QIAamp DNA Blood Mini Kit. As barras mostram o rendimento absoluto de DNA para cada amostra.

### Tecido e tecido FFPE

O desempenho do QIAasymphony DSP DNA Mini Kit foi comparado ao desempenho do QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit manual e do QIAamp DSP DNA Mini Kit usando tecido FFPE e tecido fresco/congelado, respectivamente, como material de amostra. Foram realizadas, em simultâneo, preparos de amostras manuais e automatizados e quantificação dos rendimentos de DNA. Os rendimentos de DNA após a extração de amostras de tecido FFPE e de tecido fresco/congelado usando o QIAasymphony DSP DNA Mini Kit, o QIAamp DSP DNA Mini Kit (tecido) e o QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (tecido FFPE) são exibidos na Figura 6.



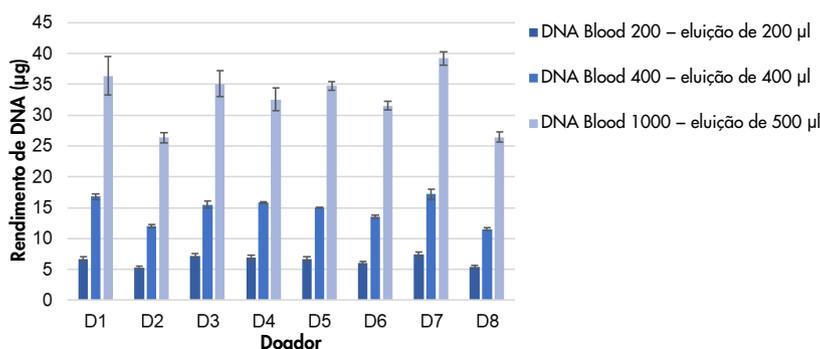
**Figura 6. Extração de DNA de amostras de tecido e tecido FFPE.** Para tecido fresco/congelado, as amostras de pulmão e de cólon humanos foram cortadas em 6 pedaços de 25 mg. Três pedaços de cada tipo de tecido foram usados para o preparo de amostras usando o QIAasymphony SP em conjunto com o protocolo DSP de alto conteúdo de tecido. A extração de DNA das amostras restantes foi realizada usando o QIAamp DSP DNA Mini Kit. O DNA foi eluído em 200 µl e o rendimento de DNA foi determinado por meio de análise espectroscópica. Para a extração de DNA de tecido FFPE, foram preparadas 12 réplicas contendo 3 seções de tecido FFPE de 10 µm de vários órgãos humanos. Seis amostras foram usadas para o preparo de amostras usando o QIAasymphony SP em conjunto com o pré-tratamento de Deparaffinization Solution e o protocolo DSP de baixo conteúdo de tecido. A extração de DNA das amostras restantes foi realizada usando o QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. O DNA foi eluído em 50 µl e o rendimento de DNA foi determinado por meio de análise espectroscópica. As barras mostram o rendimento absoluto de DNA com o desvio padrão.

## Intervalo de entrada de amostra/saída de eluato

### Sangue de DNA

Os intervalos de entrada de amostra e saída de eluato para a aplicação DNA Blood foram comparados usando amostras a partir de doadores de sangue com um intervalo de contagem de glóbulos brancos de  $5,0$  a  $8,0 \times 10^6$  células/ml.

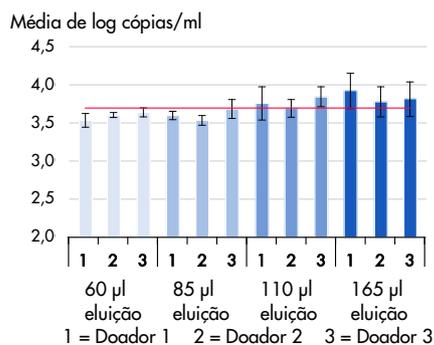
O sangue total foi coletado a partir de 8 doadores saudáveis em tubos BD K2E. O DNA foi purificado a partir de seis réplicas, cada uma usando o QIASymphony DSP DNA Mini/Midi Kit e o protocolo DNA Blood 200 DSP com volume de eluição de  $200 \mu\text{l}$ , o protocolo DNA Blood 400 DSP com volume de eluição de  $400 \mu\text{l}$  e o protocolo DNA Blood 1000 DSP com volume de eluição de  $500 \mu\text{l}$  (Figura 7).



**Figura 7. Comparação de diferentes entradas de amostra e volumes de eluição para os sistemas de purificação de DNA do sangue.** O sangue total foi coletado a partir de 8 doadores saudáveis em tubos BD K2E. A extração do DNA foi realizada usando o protocolo DNA Blood 200 com volume de eluição de  $200 \mu\text{l}$ , o protocolo DNA Blood 400 com volume de eluição de  $400 \mu\text{l}$  e o protocolo DNA Blood 1000 com volume de eluição de  $500 \mu\text{l}$ . O rendimento do DNA foi determinado por análise espectroscópica. As barras mostram o rendimento absoluto de DNA (valor médio com desvio padrão) para cada doador.

### Sangue com vírus

O sangue total foi coletado a partir de 3 doadores saudáveis, com um intervalo de contagem de glóbulos brancos de  $4,0$  a  $11,0 \times 10^6$  células/ml, em tubos BD K2E e fortificado com material padrão CMV (título  $3,7 \log$  cópias/ml). O DNA viral foi purificado a partir de 7 réplicas, cada uma usando o QIASymphony DSP DNA Mini Kit e o protocolo de sangue com vírus 200 DSP, com 4 volumes de eluição diferentes (Figura 8).



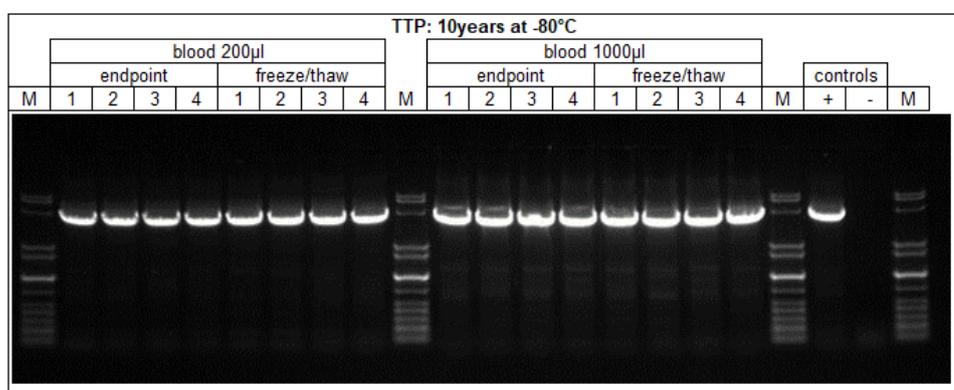
**Figura 8. Comparação da quantificação de DNA viral para diferentes volumes de eluição.** Os eluatos de cada amostra de doador e de cada volume de eluição ( $60$ ,  $85$ ,  $110$  e  $165 \mu\text{l}$ ) foram analisados com um ensaio de real-time PCR para CMV. A linha vermelha representa o título-alvo e as barras mostram a média de log cópias/ml com o desvio padrão.

## Estabilidade do eluato

Nota: A estabilidade do eluato depende muito de vários fatores e está relacionada à aplicação a jusante específica. Ela foi estabelecida para o QIAasymphony DSP Mini e Midi Kit em conjunto com as aplicações a jusante exemplares. O usuário é responsável por consultar as instruções de uso da aplicação a jusante específica usada em seu laboratório e/ou validar todo o fluxo de trabalho para estabelecer as condições de armazenamento adequadas.

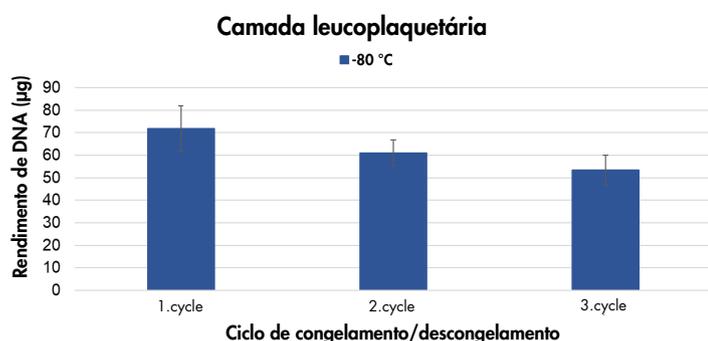
## Sangue de DNA e camada leucoplaquetária

A estabilidade do eluato para a aplicação DNA Blood foi testada usando eluatos a partir de execuções de QS realizadas com o protocolo DNA Blood 200 com volume de eluição de 200 µl e com o protocolo DNA Blood 1000 com volume de eluição de 500 µl. Os eluatos foram armazenados em tubos Sarstedt de 2 ml em temperatura ambiente, 2–8 °C, -20 °C e -80 °C. O rendimento e pureza do DNA foram determinados por análise espectroscópica. A integridade de DNA foi analisada por eletroforese em gel e um ensaio de PCR LongRange (Figura 9).



**Figura 9. Estabilidade do eluato para sangue de DNA.** O DNA foi purificado usando os protocolos DNA Blood 200 µl e 1000 µl. Os eluatos foram armazenados a -80 °C em tubos Sarstedt de 2 ml. Foram analisadas quatro réplicas. A integridade do DNA foi testada por meio de PCR de longo alcance. As figuras mostram os resultados após o armazenamento por 10 anos. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder.

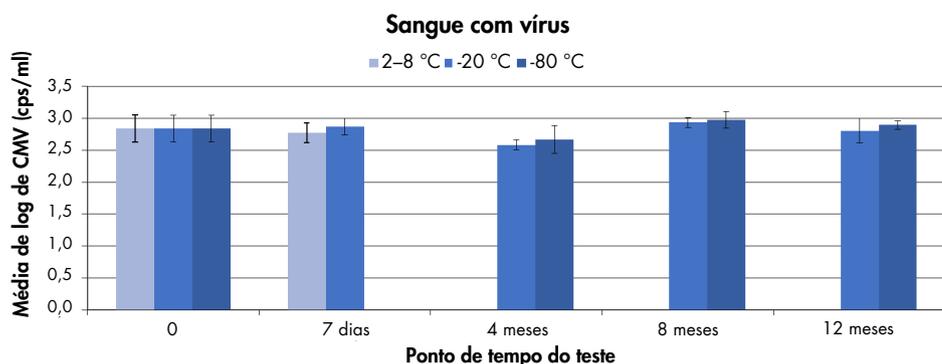
A estabilidade do eluato para a aplicação de camada leucoplaquetária foi testada usando eluatos a partir de execuções de QS realizadas com o protocolo BC de 400 µl e volume de eluição de 200 µl. Os eluatos foram armazenados em tubos Sarstedt de 2 ml e racks para microtubos de eluição em temperatura ambiente de 2–8 °C, -20 °C e -80 °C. Além disso, os eluatos foram submetidos a testes de congelamento/descongelamento por até 3 ciclos (Figura 10). O rendimento e a pureza do DNA foram determinados por análise espectroscópica. A integridade de DNA foi analisada por eletroforese em gel e um ensaio de PCR LongRange (reação de 50 µl).



**Figura 10. Ciclo de congelamento/descongelamento do eluato para camada leucoplaquetária.** O DNA foi purificado usando o protocolo DNA BC 400 µl. A camada leucoplaquetária foi gerada a partir de sangue com EDTA. Os eluatos foram armazenados em tubos Sarstedt de 2 ml. O rendimento do DNA foi determinado nos pontos de tempo do teste usando o mesmo eluato em 3 ciclos de congelamento e descongelamento. O rendimento do DNA foi determinado por análise espectroscópica. As barras mostram o rendimento absoluto de DNA (valor médio com desvio padrão).

## Sangue com vírus

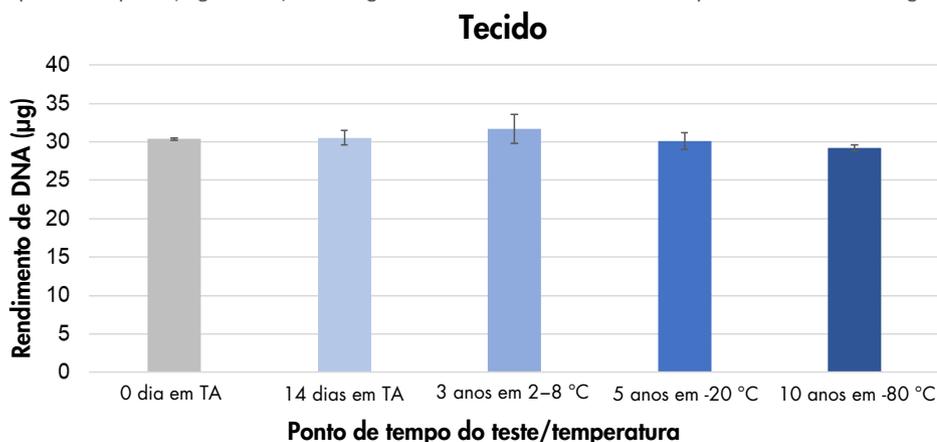
A estabilidade do eluato para a aplicação de sangue com vírus foi testada usando eluatos a partir de execuções de QS realizadas com o protocolo Virus Blood 200 com volume de eluição de 60 µl. Usou-se sangue com EDTA K<sub>2</sub> fortificado com padrão CMV comercial (título 2,7 log cópias/ml) como material de amostra. Os eluatos foram armazenados em tubos Sarstedt de 2 ml em 2–8 °C, -20 °C e -80 °C. Os eluatos foram analisados usando um ensaio em tempo real de CMV (Figura 11). A seguir, são exibidos os resultados para diversos pontos de tempo do teste.



**Figura 11. Estabilidade do eluato para aplicação de sangue com vírus.** As amostras de sangue com EDTA fortificadas com padrão CMV comercial foram purificadas com o protocolo Virus Blood 200. Os eluatos foram armazenados em várias temperaturas nos racks para microtubos de eluição e tubos Sarstedt de 2 ml. Quatro réplicas foram analisadas por ponto de tempo de teste. As barras mostram o título CMV (valor de log médio com desvio padrão).

## Tecido

A estabilidade do eluato para a aplicação de tecido foi testada usando o protocolo Tissue HC de 200 µl e volume de eluição de 200 µl. Usou-se fígado bovino fresco como material de amostra. Os eluatos foram armazenados em tubos Sarstedt de 2 ml e racks para microtubos de eluição em temperatura ambiente, 2–8 °C, -20 °C e -80 °C. O rendimento e a pureza do DNA foram determinados por análise espectroscópica (Figura 12). A integridade do DNA foi analisada por eletroforese em gel.

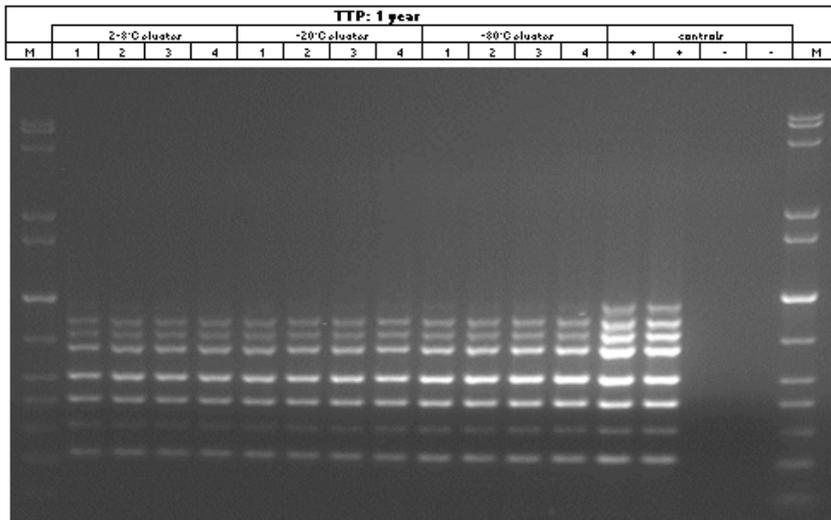


**Figura 12. Estabilidade do eluato para tecido.** O DNA foi purificado usando os protocolos DNA Tissue HC com volume de eluição de 200 µl. Usou-se fígado bovino fresco como material de amostra. Os eluatos foram armazenados em várias temperaturas nos racks para microtubos de eluição e tubos Sarstedt de 2 ml. Quatro réplicas foram analisadas por ponto de tempo de teste. O rendimento do DNA foi determinado por análise espectroscópica. As barras mostram o rendimento absoluto de DNA (valor médio com desvio padrão).

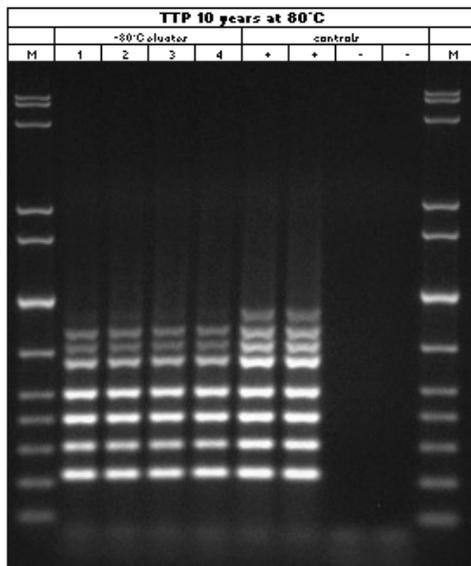
## Tecido FFPE

A estabilidade do eluato para a aplicação de tecido FFPE foi testada usando o protocolo Tissue LC de 200 µl e volume de eluição de 100 µl. Usou-se tecido FFPE humano comercial como material de amostra. Os eluatos foram armazenados em tubos Sarstedt de 2 ml e racks para microtubos de eluição em temperatura ambiente de 2–8 °C, -20 °C e -80 °C. Os eluatos foram analisados com um ensaio de PCR de 8-plex humano feito internamente (Figura 13). A seguir, são exibidos os resultados para dois pontos de tempo do teste.

**A:**



**B:**



**Figura 13. Estabilidade do eluato para tecido FFPE.** O DNA foi purificado usando o protocolo DNA Tissue LC. Usou-se tecido FFPE comercial como material de amostra. Os eluatos foram armazenados em várias temperaturas nos racks para microtubos de eluição e tubos Sarstedt de 2 ml. Quatro réplicas foram analisadas por ponto de tempo de teste. Os eluatos foram analisados por ensaio de PCR de 8-plex humano feito internamente.

## Substâncias interferentes

A influência de substâncias inibidoras, que podem estar presentes no sangue total, no desempenho da aplicação DNA Blood, aplicação de sangue com vírus e aplicação de tecido, foi testada ao adicionar as seguintes substâncias:

**Tabela 8. Substâncias potencialmente interferentes testadas para diferentes aplicações**

Substâncias interferentes	Concentração	Sangue	Sangue com vírus	Tecido
Bilirrubina	200 mg/L	√	√	√
Hemoglobina	200 g/L	√	√	
Triglicérides	30 g/L	√	√	√
Proteína	120 g/L	√	√	√

Nota: "√" indica quais materiais de amostra foram testados para a respectiva substância potencialmente interferente.

Para hemoglobina (200 g/l) e proteína (120 g/l), os níveis existentes na amostra de sangue foram determinados e hemoglobina ou proteína adicional foi adicionada para atingir as concentrações indicadas de 200 ou 120 g/l, respectivamente. Para bilirrubina (200 mg/l) e triglicédeos (30 g/l), a quantidade total de cada substância foi adicionada às amostras para atingir as concentrações indicadas.

Para tecido, a quantidade total de cada substância foi adicionada diretamente aos lisados, não foi realizada nenhuma determinação para a concentração de bilirrubina, triglicédeo ou proteína da amostra de tecido usado.

Quaisquer substâncias potencialmente interferentes (por ex., medicamentos) e a concentração correspondente são muito específicas à aplicação a jusante e a possíveis tratamentos médicos anteriores de um paciente, e precisam ser investigadas durante a verificação de tal aplicação a jusante usando os QIASymphony DSP DNA Mini e Midi Kits.

Nota: Os testes foram realizados usando aplicações a jusante exemplares para uma avaliação da qualidade dos ácidos nucleicos extraídos. Contudo, as diferentes aplicações a jusante podem ter requisitos diferentes em relação à pureza (ou seja, a ausência ou concentração de substâncias potencialmente interferentes), assim, a identificação e o teste de substâncias relevantes e respectivas concentrações também precisam ser estabelecidos como parte do desenvolvimento de aplicações a jusante para qualquer fluxo de trabalho envolvendo os QIASymphony DSP Mini e Midi Kits.

Nota: Observe que durante o desenvolvimento do QIASymphony DSP DNA Midi Kit, não foram observadas indicações de que a heparina tenha um impacto negativo no desempenho. Contudo, a ISO 20186-2:2019(E) declara que a heparina dos tubos de coleta de sangue pode afetar a pureza dos ácidos nucleicos isolados e um possível carryover nos eluatos pode causar inibições em algumas aplicações a jusante. Portanto, o usuário é responsável por validar se a heparina tem uma influência negativa em seu fluxo de trabalho.

## Sangue de DNA e camada leucoplaquetária

Para as aplicações DNA Blood, o teste foi realizado usando o protocolo DSP DNA 1000, que cobre o maior volume de entrada de amostra usando volumes de eluição de 200 e 500 µl.

Os eluatos foram analisados por análise espectroscópica quanto ao rendimento e à pureza do DNA. A compatibilidade de PCR foi testada usando um real-time PCR, bem como um ensaio de PCR de ponto final.

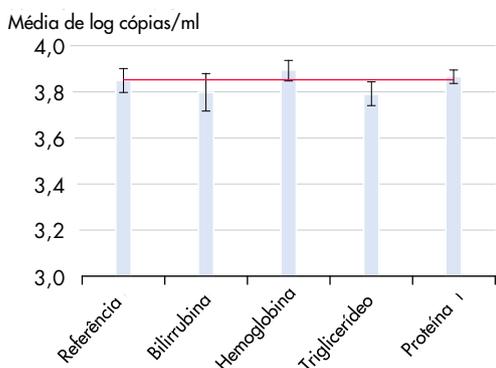
Nenhuma das substâncias listadas na Tabela 9 são interferentes, contudo, as amostras de sangue com altas concentrações de triglicerídeos (>30 g/l) podem levar a uma redução de rendimento de gDNA.

### Sangue com vírus

Para a aplicação de sangue com vírus, o teste foi realizado usando o protocolo DSP Virus Blood 200 com volume de eluição de 60 µl. As amostras de sangue negativas para CMV foram fortificadas com 500 cópias/ml (baixa concentração) e  $1 \times 10^4$  cópias/ml (alta concentração, Figura 14) de um padrão CMV comercial.

Os eluatos foram analisados com um ensaio real-time PCR para CMV.

Nenhuma das substâncias listadas na Tabela 9 são interferentes, contudo, as amostras de sangue com altas concentrações de triglicerídeos (>30 g/l) podem levar a uma redução de purificação de DNA viral.



**Figura 14. Teste de substâncias inibidoras.** O sangue total foi coletado a partir de 1 doador saudável em tubos BD K2E e fortificado com material padrão CMV (título 4,0 log cópias/ml). Cinco amostras foram testadas por meio da adição de potenciais inibidores e o DNA viral foi purificado a partir de quatro réplicas de cada amostra usando o QIASymphony DSP DNA Mini Kit e o protocolo de sangue com vírus 200 DSP com um volume de eluição de 165 µl. Os eluatos foram analisados com um ensaio real-time PCR para CMV. A linha vermelha representa o título determinado para as amostras de referência, que não foram fortificadas com qualquer substância inibidora, e as barras mostram a média de log cópias/ml com desvio padrão.

### Tecido

Para tecido de DNA (fresco e congelado), o teste foi realizado usando o protocolo DSP DNA HC e volume de eluição de 200 µl.

Os eluatos foram analisados por análise espectroscópica quanto ao rendimento e à pureza do DNA. A compatibilidade de PCR foi testada usando um ensaio real-time PCR.

Nenhuma das substâncias listadas na Tabela 9 apresentou um impacto negativo no preparo de amostras.

### Tecido FFPE

Para tecido FFPE, o teste foi realizado usando o protocolo DSP DNA LC e volume de eluição de 50 µl.

As substâncias (consulte a Tabela 9) foram adicionadas diretamente ao lisado.

**Tabela 9. Substâncias potencialmente interferentes testadas para diferentes aplicações**

Substâncias interferentes	Concentração no lisado
Xileno	Até 11%
Etanol	Até 11%
Solução de desparafinização	Até 11%
Parafina	Secção de 0,1 $\mu$ M

Os eluatos foram analisados por análise espectroscópica quanto ao rendimento e à pureza do DNA. A compatibilidade de PCR foi testada usando um PCR em tempo real, bem como um ensaio de PCR de 8-plex humano feito internamente.

Nenhuma das substâncias listadas na Tabela 9 apresentou um impacto negativo no preparo de amostras.

## Contaminação cruzada

### Sangue de DNA

O risco de contaminação cruzada da aplicação QIASymphony DNA Blood foi analisado realizando quatro execuções de 96 amostras no instrumento QIASymphony SP com lotes quadriculados alternados (amostras positivas e negativas alternadas), interrompidas por lotes totalmente negativos. Foi usado sangue masculino (contendo uma contagem de glóbulos brancos de  $\geq 1,0 \times 10^7$  células/ml e sangue feminino contendo uma contagem de glóbulos brancos entre  $4,0 \times 10^6$  e  $9 \times 10^6$  células/ml) como um sistema modelo. O preparo de amostras foi realizado usando o protocolo de sangue de 1000  $\mu$ l, que cobre o maior volume de amostras. Uma possível contaminação das amostras femininas negativas durante as execuções de extração foi avaliada pela análise subsequente dos eluatos usando um real-time PCR para o cromossomo Y.

Não foi detectada nenhuma contaminação cruzada para carryover de amostra a amostra, ou lote a lote ou execução a execução.

## Símbolos

Os seguintes símbolos aparecem neste documento. Para obter uma lista completa dos símbolos usados nestas instruções de uso ou na embalagem e etiqueta, consulte o manual.

Símbolo	Definição do símbolo
	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
<b>Rn</b>	R representa a revisão das Instruções de uso e n representa o número de revisão
	Fabricante

## Histórico de revisões

Revisão	Descrição
R1, junho de 2022	Versão 2, Revisão 1 <ul style="list-style-type: none"><li>• Atualização para a versão 2 para conformidade com o IVDR</li><li>• Seções para Substâncias interferentes, Contaminação cruzada, Estabilidade do eluato e Compatibilidade com aplicações a jusante adicionadas</li></ul>

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®, QIASymphony®, QIAamp®, EZ1®, UltraRun® (QIAGEN Group); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.). 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-3029-D01-001 © 2022 QIAGEN, todos os direitos reservados.

