

Fevereiro de 2017

# Kit QIAasymphony<sup>®</sup> DSP Circulating DNA

Características de desempenho

IVD

CE

MAT

937556

---

# Sumário

Características de desempenho .....	4
Desempenho básico .....	4
Precisão da execução .....	6
Desempenho equivalente de protocolos de 2 ml e 4 ml.....	6
Distribuição de tamanho .....	8
Estabilidade do eluato .....	10

---

O sistema QIAasymphony 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 kit QIAasymphony DSP Circulating DNA destina-se ao uso somente em conjunto com o instrumento QIAasymphony SP.

O kit QIAasymphony DSP Circulating DNA fornece reagentes para a purificação totalmente automatizada e simultânea de ccfDNA a partir de uma extensa série de tipos de plasma humano (EDTA ou citrato anticoagulado, assim como plasma retirado de tubos de coleta de sangue com ccfDNA estabilizado) e urina humana (estabilizada ou não estabilizada). Não foi estabelecida uma característica de desempenho para cada tubo de coleta de sangue; o usuário deve validá-la.

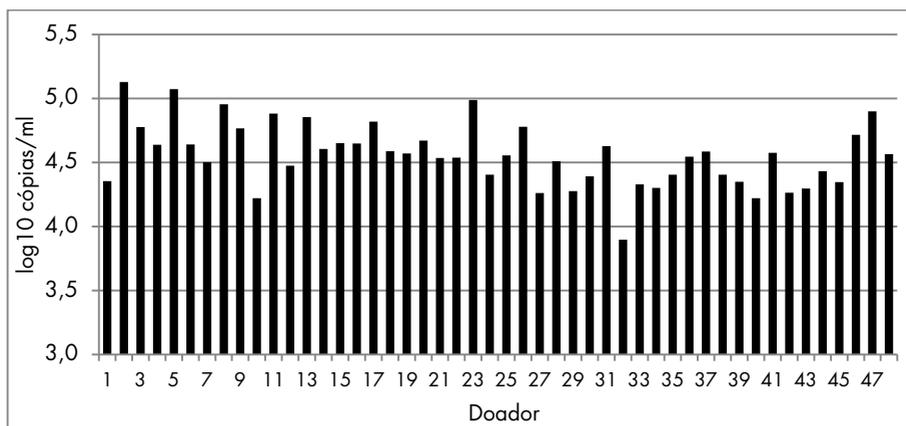
O ccfDNA purificado é compatível com uma série extensa de aplicações a jusante. O QIAasymphony SP executa todas as etapas do processo de purificação. Em uma única execução são processadas até 96 amostras em lotes de 24. As amostras de urina podem exigir pré-tratamento manual de amostra.

# Características de desempenho

## Desempenho básico

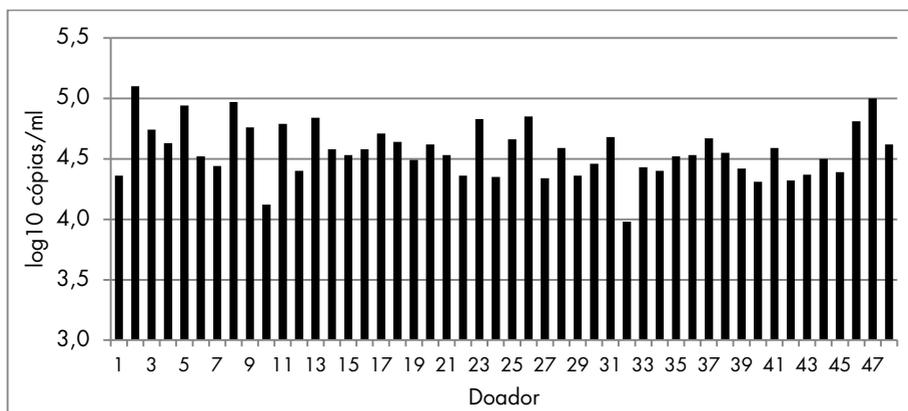
O desempenho básico do kit QIAasymphony DSP Circulating DNA foi avaliado utilizando 48 doadores individuais de ccfDNA extraído de 4 ml de plasma estabilizado, 4 ml de plasma de EDTA e 4 ml de urina estabilizada. O rendimento de ccfDNA foi determinado com um teste de PCR em tempo real feito internamente para a sequência codificadora do RNA ribossomal 18S.

A diferença entre os rendimentos ( $\log_{10}$  cópias/ml) na Figura 1 (4 ml de plasma estabilizado), na Figura 2 (4 ml de plasma de EDTA) e na Figura 3 (4 ml de urina estabilizada) reflete as fortes concentrações de ccfDNA dependentes de doadores tipicamente encontradas no mesmo volume do respectivo material de amostra. O rendimento de ccfDNA entre plasma estabilizado e EDTA apresenta uma correlação elevada para os 48 doadores individuais que utilizam plasma de dois tipos diferentes de BCTs (Figura 1 e Figura 2).

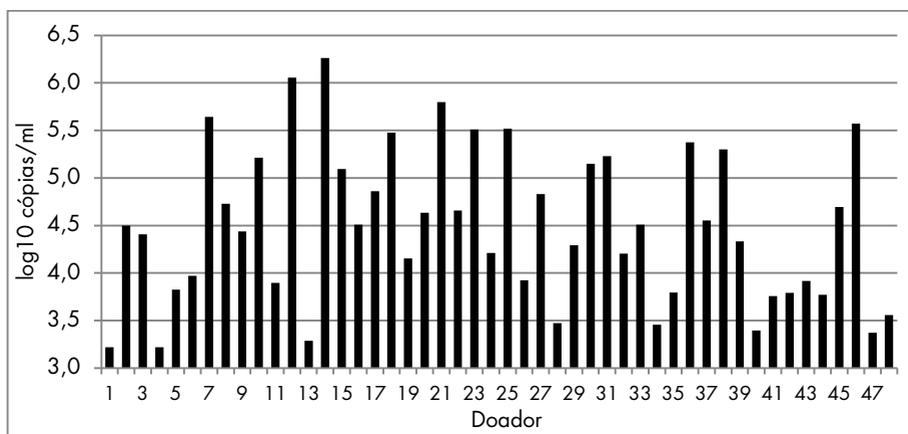


**Figura 1. Rendimento de ccfDNA provindo do plasma de 48 doadores individuais: tubos de coleta de sangue com ccfDNA estabilizado.** A doação de sangue de 48 doadores individuais foi feita em tubos de coleta de sangue com ccfDNA estabilizado. O ccfDNA foi extraído de 4 ml de plasma utilizando o kit

QIAasymphony DSP Circulating DNA e o rendimento de ccfDNA foi quantificado utilizando um teste de PCR em tempo real feito internamente para a sequência codificadora 18S. Os resultados foram calculados como cópias-alvo por ml de inserção de plasma.



**Figura 2. Rendimento de ccfDNA do plasma de 48 doadores individuais: tubos de coleta de sangue com EDTA.** A doação de sangue de 48 doadores individuais foi feita em tubos de coleta de sangue com EDTA. O ccfDNA foi extraído de 4 ml de plasma utilizando o kit QIAasymphony DSP Circulating DNA e o rendimento de ccfDNA foi quantificado utilizando um teste de PCR em tempo real feito internamente para a sequência codificadora 18S. Os resultados foram calculados como cópias-alvo por ml de inserção de plasma.



**Figura 3.** Rendimento de ccfDNA da urina estabilizada de 48 doadores individuais. A urina de 48 doadores individuais foi estabilizada imediatamente após a coleta. O ccfDNA foi extraído de 4 ml de urina utilizando o kit QIASymphony DSP Circulating DNA e o rendimento de ccfDNA foi quantificado utilizando um teste de PCR em tempo real feito internamente para a sequência codificadora 18S. Os resultados foram calculados como cópias-alvo por ml de entrada de urina.

## Precisão da execução

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

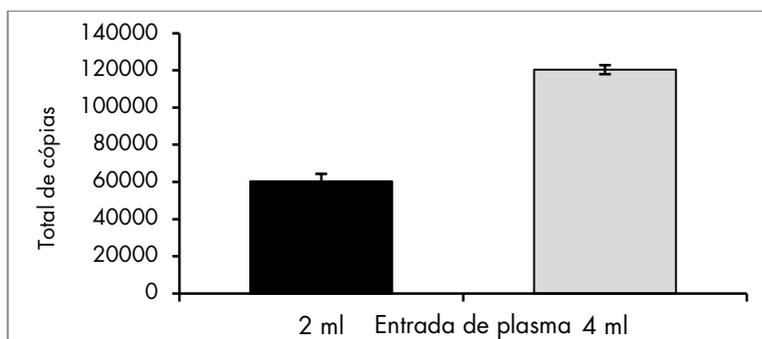
**Tabela 1. Análise das estimativas de precisão**

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

## Desempenho equivalente de protocolos de 2 ml e 4 ml

O desempenho equivalente de protocolos para inserção de amostra de 2 ml e 4 ml foi avaliado para o kit QIASymphony DSP Circulating DNA utilizando ccfDNA endógeno extraído de um pool de plasma humano com EDTA. Foi realizado um total de 8 execuções independentes de QIASymphony, cada operação em 4 lotes com 8 replicações por lote. A faixa linear do procedimento do kit QIASymphony DSP Circulating DNA para a sequência de codificação 18S foi determinada com um teste de PCR em tempo real feito internamente

(Figura 4). A taxa de diferença dos protocolos de 2 ml e 4 ml é exibida na Tabela 2. (O protocolo de referência é a inserção de amostra de 4 ml.)



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

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

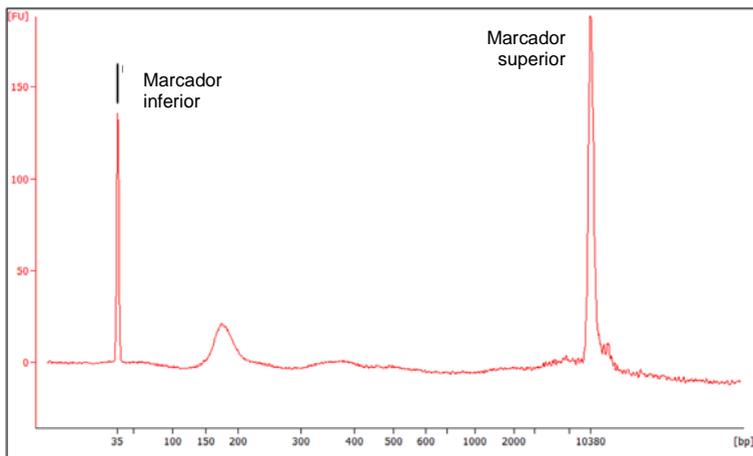
Parâmetro	Valor
Taxa estimada da média geométrica em cópias/ml calculadas	1,01
Limite de confiança de 95% inferior	0,92
Limite de confiança de 95% superior	1,11

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

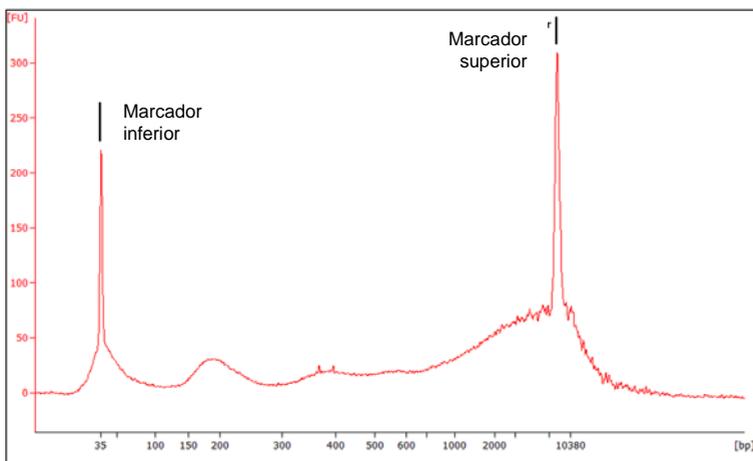
## Distribuição de tamanho

Para avaliar a distribuição de tamanho da saída de amostra, extraiu-se o ccfDNA de uma inserção de amostra de 4 ml utilizando o kit QIAAsymphony DSP Circulating DNA, 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 replicações independentes. Um perfil de DNA representativo é exibido para o plasma na Figura 5 e para a urina estabilizada na Figura 6.

O electroferograma do plasma na Figura 5 mostra o pico frequentemente observado a aprox. 160 pb, variando de 145 pb a 196 pb, o que fica na faixa do comprimento do DNA ligado à histona no nucleossomo. O electroferograma da urina na Figura 6 mostra que o pico predominante a aprox. 160 pb é mais amplo, variando de aprox. 145 pb a 250 pb. Além disso, para a urina há um segundo pico que varia entre aprox. 20 pb e 100 pb (no nível do pico do marcador inferior) indicando um segmento de ccfDNA com um grau de fragmentação mais elevado. Também, a Figura 6 mostra um número elevado de fragmentos longos de DNA de aprox. 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 5. Distribuição de tamanho do ccfDNA do plasma (perfil Bioanalyzer).** O ccfDNA foi extraído de 4 ml de plasma com EDTA utilizando o kit QIAasymphony DSP Circulating DNA; 1  $\mu$ l de eluato foi submetido a uma análise com o Agilent High Sensitivity DNA Chip. Eixo X: Tamanho do par de base (pb); Eixo Y: Unidades de fluorescência (UF).

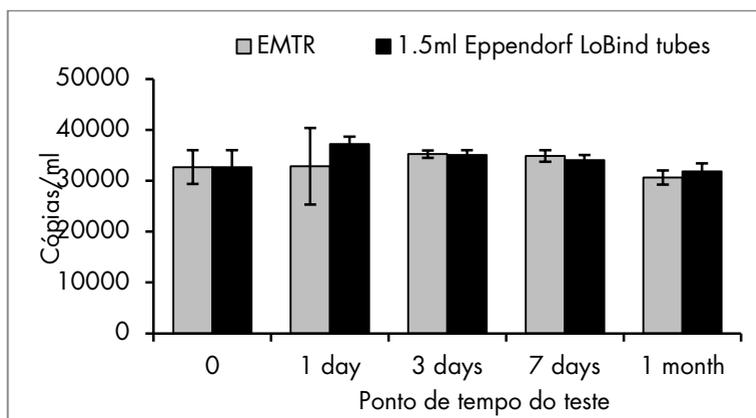


**Figura 6. Distribuição de tamanho do ccfDNA da urina (perfil Bioanalyzer).** O ccfDNA foi extraído de 4 ml de urina estabilizada utilizando o kit QIAasymphony DSP Circulating DNA; 1  $\mu$ l de eluato foi submetido a uma análise com o Agilent High Sensitivity DNA Chip. Eixo X: Tamanho do par de base (pb); Eixo Y: Unidades de fluorescência (UF).

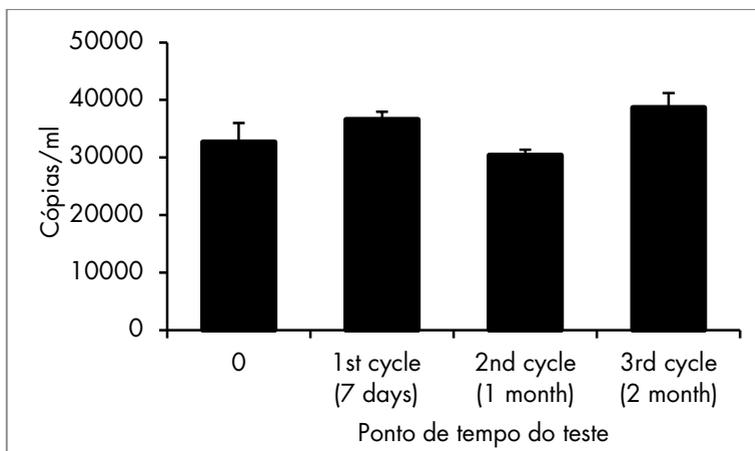
## Estabilidade do eluato

A estabilidade do eluato para o kit QIASymphony DSP Circulating DNA 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 (Microtubos de eluição CL 96; n° de catálogo 19588) e tubos de 1,5 ml Eppendorf® LoBind com trava de segurança na tampa de encaixe “snap cap”. Os eluatos foram analisados em replicações de 8. A estabilidade do DNA em eluatos foi determinada com um teste de PCR em tempo real 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 (Figura 7). A estabilidade do DNA nos tubos LoBind não foi afetada pelo armazenamento de -15 a -30°C que inclui 3 ciclos de congelamento e descongelamento após 7 dias, um mês e dois meses (Figura 8).



**Figura 7. 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 kit QIASymphony DSP Circulating DNA e foi armazenado a 2–8°C em diferentes pontos de tempo do teste. O rendimento de ccfDNA foi quantificado utilizando um teste de PCR em tempo real feito internamente para a sequência codificadora 18S. Os resultados foram calculados como cópias-alvo por ml de inserção de plasma.



**Figura 8. Estabilidade do ccfDNA nos eluatos armazenados de -15 a -30°C incluindo 3 ciclos de congelamento e descongelamento.** O ccfDNA foi extraído de plasma com EDTA utilizando o kit QIAasymphony DSP Circulating DNA e foi armazenado de -15 a -30°C em tubos Eppendorf LoBind de 1,5 ml. O rendimento do ccfDNA foi determinado em 3 pontos de tempo do teste utilizando o mesmo eluato em 3 ciclos de congelamento e descongelamento. O rendimento de ccfDNA foi quantificado utilizando um teste de PCR em tempo real feito internamente para a sequência codificadora 18S. Os resultados foram calculados como cópias-alvo por ml de entrada de plasma.

---

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

Marcas registradas: QIAGEN<sup>®</sup>, Sample to Insight<sup>®</sup>, QIAasymphony<sup>®</sup> (QIAGEN Group); Eppendorf<sup>®</sup> (Eppendorf AG).

Os nomes registrados, marcas registradas, etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcadas especificamente como tais, não devem ser considerados como não protegidos pela lei.

02/2017 HB-2309-D01-001

© 2017 QIAGEN, todos os direitos reservados



