

Istruzioni per l'uso (caratteristiche delle prestazioni) di QIAamp® DSP Circulating NA Kit

Versione 2

IVD

Per uso diagnostico in vitro

Da utilizzare solo con QIAamp DSP Circulating NA Kit

CE

REF

61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Germania

R1

Le caratteristiche delle prestazioni sono disponibili in via elettronica nella scheda delle risorse della pagina prodotti all'indirizzo www.qiagen.com.

Introduzione generale

Il QIAamp DSP Circulating NA Kit è un sistema che utilizza la tecnologia su membrana di silice (tecnologia QIAamp) per l'isolamento manuale e la purificazione di DNA e RNA liberi circolanti (ccf) di campioni di plasma di sangue umano.

Questo prodotto è rivolto a utenti professionisti, quali tecnici e medici esperti in tecniche di biologia molecolare.

Il QIAamp DSP Circulating NA Kit è destinato all'uso diagnostico in vitro.

Resa degli acidi nucleici (Nucleic Acids, NA) purificati

I campioni di plasma possono presentare un'alta varianza nella resa degli acidi nucleici purificati. Pertanto gli utenti dovrebbero ottimizzare il plasma immesso e il volume di eluizione per il loro target specifico e l'applicazione a valle in laboratorio.

Se il kit viene utilizzato unitamente a un'applicazione QIAGEN® a valle, per le istruzioni consultare il manuale del kit pertinente.

Analisi delle applicazioni a valle

Gli acidi nucleici isolati con il QIAamp DSP Circulating NA Kit sono pronti per essere usati in varie applicazioni a valle. Per valutare le prestazioni, sono stati isolati gli acidi nucleici provenienti dal plasma di sangue umano di un singolo donatore utilizzando tre diverse provette per i prelievi ematici (BD Vacutainer® K2EDTA Tube, Becton Dickinson and Company; PAXgene® Blood ccfDNA Tube, PreAnalytiX GmbH; e Streck® Cell-Free DNA Blood Collection Tube (BCT)®, Streck; $n = 24$ donatori ciascuna). Sono stati analizzati gli eluiti provenienti da 1 ml di plasma immesso utilizzando la PCR quantitativa (qPCR, Figura 1A), la digital droplet PCR (ddPCR, Figura 1B) e la qPCR con trascrizione inversa (RT-qPCR) per RNA (solo plasma in BD Vacutainer K2EDTA Tube, Figura 2).

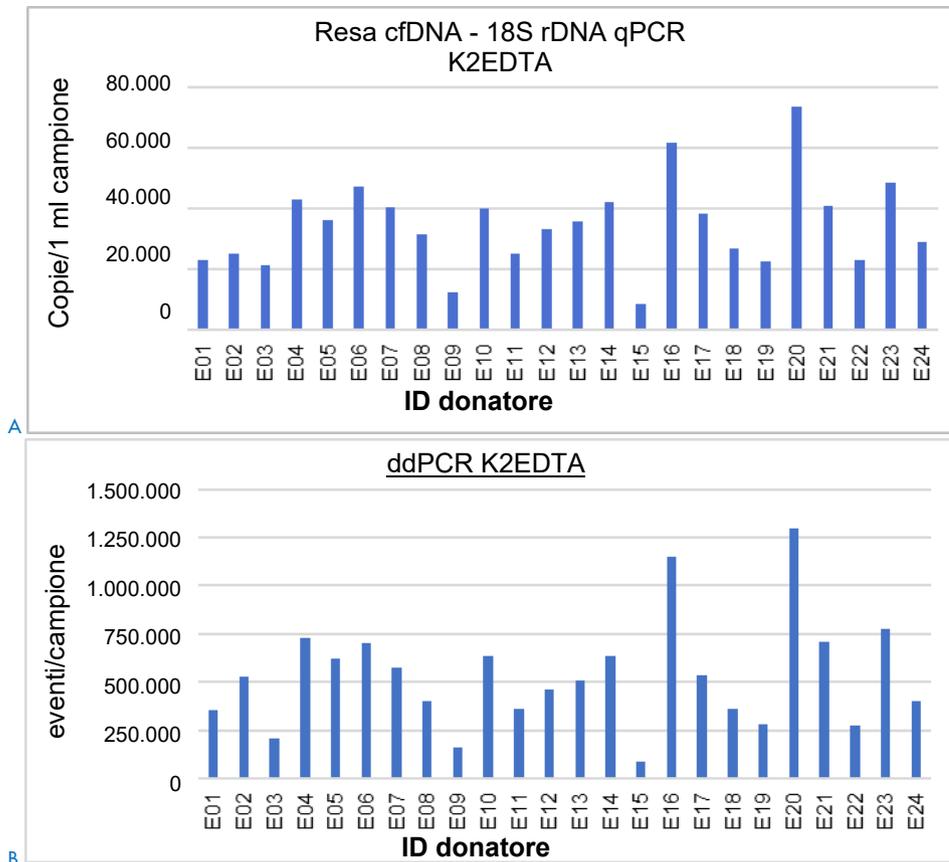


Figura 1. Confronto del plasma di un unico donatore (volume immesso 1 ml) fra qPCR e ddPCR (Bio-Rad®)

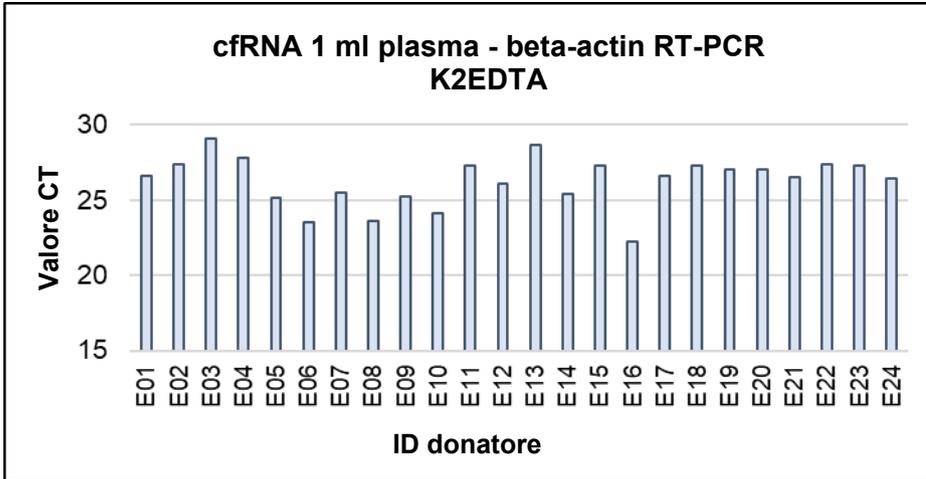


Figura 2. Rilevamento di RNA libero nel plasma di un unico donatore (volume immesso 1 ml) tramite esame qPCR con trascrizione inversa per il gene umano beta-actin (lunghezza dei frammenti 293 bp).

Per l'analisi del sequenziamento in parallelo (Next Generation Sequencing, NGS), sono stati generati eluiti da un volume di plasma immesso di 5 ml (BD Vacutainer K2EDTA Tube, PAXgene Blood ccfDNA Tube e Streck Cell-Free DNA BCT; n = 8 donatori ciascuna). La resa totale del DNA per 5 ml di plasma andava da 50 a 150 ng di DNA rilevato con il Qubit® HS dsDNA Assay. L'analisi dell'NGS è stata eseguita tramite il GeneRead® QIAact Actionable Insights Tumor Panel e il sistema GeneReader®. Tutti i campioni sono stati arricchiti con successo e sono state generate le librerie. Più del 98% delle letture generate sono state mappate al genoma umano e >99,8% delle posizioni nelle porzioni di interesse avevano una copertura base di $\geq 500x$.

Per entrambe le specie degli acidi nucleici (DNA e RNA) è stata evidenziata la riuscita applicazione delle tecnologie a valle (Figura 3).

| | qPCR | ddPCR | RT-qPCR | NGS |
|---------|------|-------|-------------|-----|
| K2EDTA | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| PAXgene | ✓ | ✓ | non testato | ✓ |
| Streck | ✓ | ✓ | non testato | ✓ |

Figura 3. Utilizzo riuscito degli acidi nucleici isolati con applicazioni a valle diverse.

L'utente dovrebbe ottimizzare il plasma immesso e il volume di eluizione per la sua molecola target e tutte le successive procedure impiegate in laboratorio, oppure fare riferimento alle prestazioni specifiche della relativa applicazione a valle.

Stabilità degli eluiti

La stabilità degli eluiti dipende dal contenuto e dal tipo di acidi nucleici isolati, dal volume di eluizione e dalle condizioni di conservazione. Si raccomanda agli utenti di verificare la stabilità degli eluiti in base alle proprie esigenze specifiche.

È stata analizzata la stabilità degli eluiti per il DNA e per gli eluiti derivati dal plasma umano generato da BD Vacutainer K2EDTA Tube (Becton Dickinson and Company) e dalle provette per prelievo ematico a fini di stabilizzazione (PAXgene Blood ccfDNA Tube e Streck Cell-Free DNA BCT). Gli eluiti sono stati conservati a temperature comprese fra -30°C e -15°C e fra -90°C e -65°C . Non è stato osservato alcun deterioramento in un periodo di 12 mesi. Gli eluiti conservati a $2-8^{\circ}\text{C}$ e a temperatura ambiente ($15-25^{\circ}\text{C}$) sono rimasti stabili per un periodo pari a 48 ore. Tutte le condizioni sono state valutate tramite la qPCR rivolta al gene umano rDNA 18S.

È stata analizzata la stabilità degli eluiti per l'RNA e per gli eluiti derivati dal plasma umano generato da BD Vacutainer K2EDTA Tubes (Becton Dickinson and Company). Gli eluiti sono stati conservati a temperature comprese fra -30°C e -15°C e fra -90°C e -65°C . Non è stato osservato alcun deterioramento in un periodo di 6 mesi. Gli eluiti conservati a $2-8^{\circ}\text{C}$ sono rimasti stabili per un periodo pari a 48 ore. Tutte le condizioni sono state valutate tramite la RT-qPCR rivolta al gene umano beta-actin.

Se il kit viene utilizzato unitamente ad applicazioni QIAGEN, per le istruzioni consultare il manuale del kit pertinente.

Precisione dell'isolamento degli acidi nucleici

La precisione è stata valutata utilizzando plasma umano e le condizioni sono state valutate utilizzando la qPCR rivolta al gene umano rDNA 18S.

La configurazione sperimentale comprendeva 12 cicli di purificazione con 12 replicati ciascuno (per un totale di 144 purificazioni). I cicli di purificazione sono stati concordati con tre operatori diversi, in tre giorni diversi, con tre strumenti diversi e utilizzando tre lotti diversi del QIAamp DSP Circulating NA Kit. Per ogni singolo parametro e per la variabilità complessiva (totale) del QIAamp DSP Circulating NA Kit sono stati determinati la deviazione standard (DS) e il coefficiente di variazione (CV) (Tabella 1).

Tabella 1. Risultati della precisione

| Precisione | | | |
|--------------------------|----------------|-------|--------|
| Parametro | Media copie/ml | DS | CV (%) |
| Da ciclo a ciclo | 25.894 | 461 | 1,78 |
| Da operatore a operatore | | 1.392 | 5,38 |
| Da strumento a strumento | | 228 | 0,88 |
| Da giorno a giorno | | 2.096 | 8,09 |
| Da lotto a lotto | | 969 | 3,74 |
| Totale | | 3.120 | 12,05 |

Linearità

Sono stati generati i dati per un volume di plasma immesso di 1–5 ml, proveniente dal sangue conservato nelle provette BD Vacutainer K2EDTA Tube, PAXgene Blood ccfDNA Tube e Streck Cell-Free DNA BCT. Per tutte le BCT è stato osservato un aumento lineare della resa di DNA (vedere Figura 4); per le BD Vacutainer K2EDTA Tube, l'esito è stato lo stesso per l'RNA.

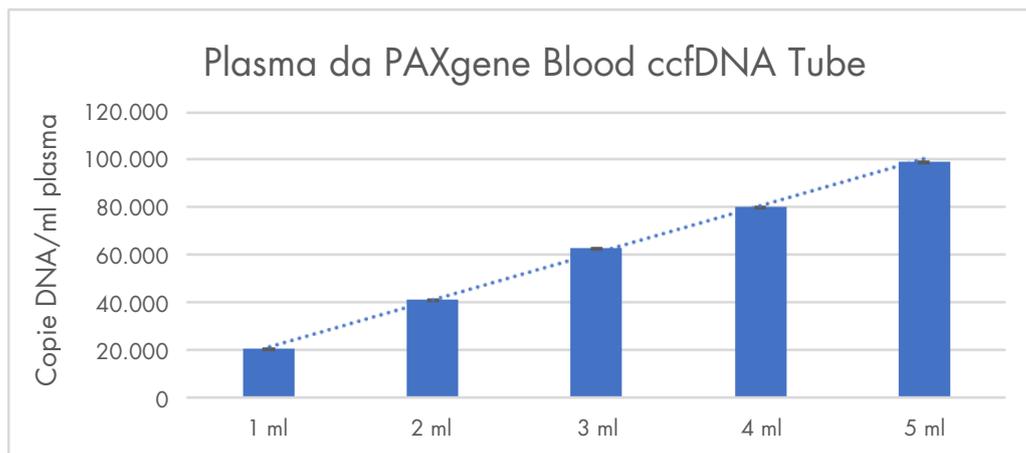


Figura 4. Aumento lineare della resa totale di DNA (plasma immesso in copie/ml di DNA) per volumi diversi di plasma immesso. Dati mostrati per il plasma generato da PAXgene Blood ccfDNA Tube, risultati equivalenti per il plasma derivato da BD Vacutainer K2EDTA Tube (DNA/RNA) e Streck Cell-Free DNA BCT.

Equivalenza dei protocolli (protocolli Breeze/classico)

L'equivalenza delle prestazioni fra il protocollo Breeze e il protocollo classico è stata determinata dimostrando che il corrispondente limite di confidenza al 95% di differenza nel valore Ct medio (RNA) o nella media di copie/ml (DNA) rientrava in $\pm 2 \times DS$, essendo DS la precisione osservata del protocollo classico (condizione di riferimento). Sono stati usati tre lotti del kit e gli esperimenti sono stati condotti da tre operatori.

La precisione totale (DS) dei valori Ct generati per il protocollo Breeze era inferiore al limite superiore dell'intervallo di previsione al 95% bilaterale per la precisione totale (DS) del protocollo classico, in cui l'intervallo di previsione è stato calcolato all'interno dello studio impiegando i dati provenienti dal protocollo classico ($n = 143$) e utilizzando il numero di punti dati per il protocollo Breeze ($n = 144$) nello studio.

Sostanze interferenti

Le sostanze potenzialmente interferenti possono avere origine da diverse fonti, ad esempio metaboliti naturali, sostanze introdotte durante il trattamento del paziente o sostanze ingerite dal paziente. Per il QIAamp DSP Circulating NA Kit sono stati analizzati come componenti endogeni l'emoglobina, i trigliceridi, l'EDTA, la caffeina, l'albumina, la bilirubina coniugata e la bilirubina non coniugata. Non sono state rilevate interferenze con l'applicazione della qPCR come applicazione a valle. Inoltre non sono state osservate interferenze derivate dai componenti del QIAamp DSP Circulating NA Kit (proteinasasi K, Buffer ACL, Buffer ACB, Buffer ACW1, Buffer ACW2 ed etanolo) durante l'elaborazione dei campioni e l'estrazione degli acidi nucleici.

A causa della complessità delle sostanze potenzialmente interferenti e della diversa sensibilità delle specifiche applicazioni a valle, raccomandiamo agli utenti di valutare l'effetto delle sostanze interferenti specifiche per il proprio flusso di lavoro e di validare il metodo di controllo dell'interferenza nella propria specifica applicazione diagnostica a valle.

Per maggiori informazioni sulle sostanze interferenti in specifiche applicazioni QIAGEN a valle, consultare i manuali dei relativi kit.

Contaminazione crociata

Per valutare il livello della contaminazione crociata, sono state aggiunte 105 copie di virus dell'HBV in 5 ml o 2 ml di plasma del sangue umano (campioni positivi) e sono state isolate adiacenti a campioni privi di virus (campioni negativi) in una configurazione a scacchiera, alternate con cicli di estrazione contenenti solo campioni negativi (per valutare la contaminazione crociata intra-estrazione e fra le estrazioni). Lo studio aveva lo scopo di simulare la situazione in cui campioni contenenti un elevato livello di molecole target degli acidi nucleici possono provocare la contaminazione crociata di altri campioni nel corso della procedura di estrazione. La purificazione degli acidi nucleici è stata condotta utilizzando un lotto di reagenti. La contaminazione crociata è stata valutata tramite l'*artus*[®] HBV RG CE PCR Kit. I risultati non hanno mostrato alcuna contaminazione crociata nell'intero sistema.

Simboli

| | |
|---|---|
|  | Questo prodotto soddisfa i requisiti del Regolamento europeo 2017/746 per i dispositivi medico-diagnostici in vitro. |
|  | Dispositivo medico-diagnostico in vitro |
|  | Numero di catalogo |
|  | Produttore |
| Rn | R indica la revisione delle Istruzioni per l'uso (caratteristiche delle prestazioni) e n indica il numero della revisione |

Cronologia delle revisioni del documento

| Revisione | Descrizione |
|-----------------|--|
| R1, giugno 2022 | Aggiornamento di QIAamp DSP Circulating Kit V2 conforme all'IVDR Aggiunta di isolamento "manuale" nell'uso previsto. Nessuna modifica ai dati delle prestazioni rispetto al Kit Versione 1. |

Per informazioni aggiornate sulle licenze e sulle esclusioni di responsabilità specifiche del prodotto, vedere il manuale del kit QIAGEN o il manuale dell'utente. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti ai servizi tecnici QIAGEN o al distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, artus®, GeneRead®, GeneReader® (Gruppo QIAGEN); 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 o sue controllate). I marchi registrati, di fabbrica e così via utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, devono essere considerati come protetti dalla legge.
06/2022 HB-3049-D01-001 © 2022 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

