



Giugno 2022

Istruzioni per l'uso (Caratteristiche delle prestazioni) del QIASymphony[®] DSP DNA Kit

Versione 2

IVD

Per uso diagnostico in vitro

Da utilizzare con il QIASymphony DSP DNA Mini Kit e il QIASymphony DSP DNA Midi Kit.



REF

937236, 937255



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Germania

R1

Le caratteristiche delle prestazioni sono disponibili in formato elettronico e si trovano nella scheda risorse della pagina dei prodotti su www.qiagen.com.

Introduzione generale

I QIASymphony DSP DNA Kit sono studiati per essere utilizzati esclusivamente in combinazione con il sistema QIASymphony SP.

I QIASymphony DSP DNA Mini Kit contengono reagenti per la purificazione automatizzata del DNA totale da sangue intero umano, buffy coat, tessuti e tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE), nonché DNA virale da sangue intero umano. I QIASymphony DSP DNA Midi Kit contengono reagenti per la purificazione automatizzata del DNA totale da sangue intero umano e buffy coat. Tuttavia, le caratteristiche di prestazione per ogni provetta di raccolta del sangue o tipo di tessuto non sono state stabilite e devono essere convalidate dall'utente.

La tecnologia a particelle magnetiche consente di purificare gli acidi nucleici di alta qualità che sono privi di proteine, nucleasi e altre impurità. Gli acidi nucleici purificati sono pronti per l'uso diretto in applicazioni a valle, come le reazioni di amplificazione (PCR). QIASymphony SP esegue tutte le fasi della procedura di purificazione. In una singola sessione possono essere processati fino a 96 campioni, in batch comprendenti max. 24 campioni.

Di seguito sono riportati alcuni dati sulle prestazioni per le diverse applicazioni.

Caratteristiche delle prestazioni

Nota: le caratteristiche di prestazione dipendono fortemente da vari fattori e sono legate alla specifica applicazione a valle. Sono state stabilite per i QIASymphony DSP DNA Mini e Midi Kit in combinazione con applicazioni a valle esemplari. Tuttavia, i metodi per l'isolamento degli acidi nucleici dai campioni biologici sono utilizzati come front-end per molteplici applicazioni a valle. I parametri di prestazione, come la contaminazione crociata o la precisione della corsa, devono essere stabiliti per qualsiasi flusso di lavoro come parte dello sviluppo dell'applicazione a valle. Pertanto, è responsabilità dell'utente convalidare l'intero flusso di lavoro per stabilire i parametri di prestazione appropriati.

Prestazioni di base e compatibilità con diverse applicazioni a valle

Sangue DNA e buffy coat

Resa del DNA

Le prestazioni di base del QIASymphony DSP DNA Mini Kit sono state valutate utilizzando diverse provette di raccolta e anticoagulanti, nonché sangue intero umano sia fresco che congelato. Il sangue intero è stato prelevato da 3 donatori sani (conta dei globuli bianchi [WBC] da 4,0 a 11,0 x 10⁶ cellule/ml) in 3 diversi tipi di provette: EDTA, 10 ml BD™ Vacutainer® 16 x 100 mm (K2-EDTA); citrato, 2,7 ml Sarstedt® S-Monovette® 9NC provetta 13 x 75 mm (citrato); eparina, 7,5 ml Sarstedt S-Monovette 15 x 92 mm (litio-eparina). Il sangue è stato utilizzato sia fresco (conservato a 2–8°C) sia congelato (conservato a -20°C). Il DNA genomico è stato purificato da campioni di 200 µl, con 4 replicati per donatore e tipo di provetta, utilizzando il QIASymphony DSP DNA Mini Kit e il protocollo Blood 200 DSP con un volume di eluizione di 200 µl. La resa e la purezza del DNA sono state determinate mediante analisi spettroscopica (Figura 1).

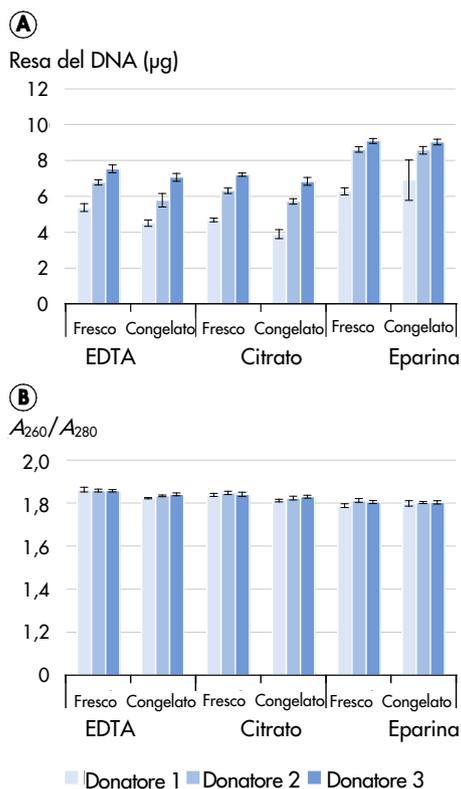


Figura 1. Resa del DNA e purezza misurata utilizzando diverse provette di raccolta dei campioni e anticoagulanti con sangue intero umano fresco e congelato. A Resa del DNA: le barre del grafico mostrano la resa assoluta del DNA con deviazione standard. **B** Purezza del DNA: le barre del grafico mostrano la purezza del DNA con deviazione standard.

Integrità del DNA

I prodotti di PCR a lungo raggio (5 kb) sono stati amplificati utilizzando un esame di PCR a lungo raggio (Figura 2).

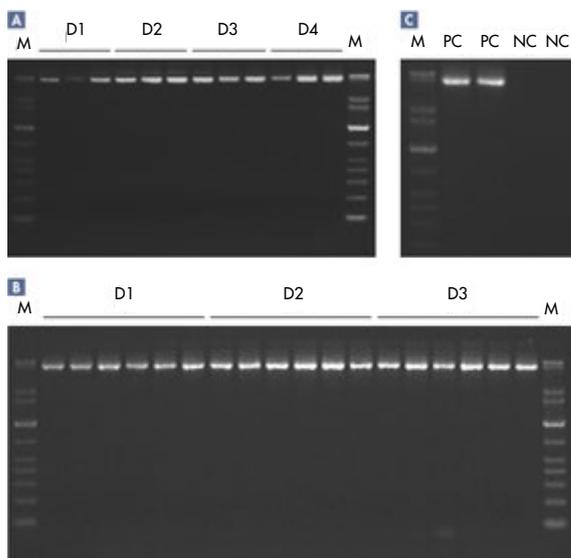


Figura 2. Integrità del DNA testata mediante PCR a lungo raggio. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder. **A** Il sangue intero è stato raccolto da 4 donatori sani (D) in provette BD K2E. Il DNA genomico per la PCR a lungo raggio è stato purificato da aliquote di 200 μ l in triplicato utilizzando il QIASymphony DSP DNA Mini Kit e il protocollo Blood 200 DSP con un volume di eluizione di 200 μ l. D1, donatore 1; D2, donatore 2; D3, donatore 3; e D4, donatore 4. **B** Il sangue intero è stato raccolto da 3 donatori sani in provette BD K2E ed è stato preparato il buffy coat. Il DNA genomico è stato purificato da aliquote di 200 μ l in 6 replicati utilizzando il QIASymphony DSP DNA Mini Kit e il protocollo buffy coat 200 DSP con un volume di eluizione di 200 μ l. D1, donatore 1; D2, donatore 2; e D3, donatore 3. **C** Controlli: PC, controllo positivo; e NC, controllo negativo.

Correlazione tra resa del DNA e conta dei globuli bianchi

Le prestazioni dell'applicazione QIASymphony DSP DNA Blood e buffy coat sono state valutate utilizzando campioni di sangue e buffy coat con 6 diverse conte WBC per ciascun tipo di campione. Per il sangue intero le conte dei globuli bianchi sono risultate comprese fra 4×10^6 cellule/ml e $11,6 \times 10^6$ cellule/ml, mentre il buffy coat fra $2,2 \times 10^7$ cellule/ml e $5,6 \times 10^7$ cellule/ml. Le rese del DNA sono state calcolate mediante analisi spettroscopica e rappresentate graficamente rispetto alla conta dei globuli bianchi (Figura 3).

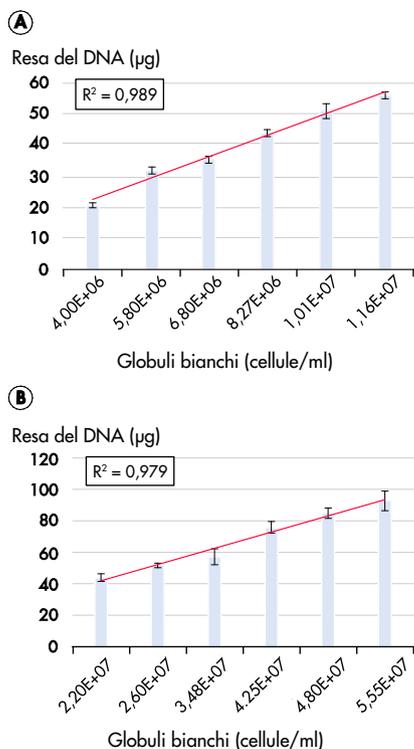


Figura 3. Correlazione tra resa del DNA e conta dei globuli bianchi. **A** Il DNA genomico è stato purificato da 1 ml di sangue intero umano utilizzando il QIAasympyony DSP DNA Midi Kit e il protocollo Blood 1000 DSP con un volume di eluizione di 500 µl. Le barre del grafico mostrano la resa assoluta del DNA con deviazione standard. **B** Il DNA genomico è stato purificato da 400 µl di buffy coat utilizzando il QIAasympyony DSP DNA Midi Kit e il protocollo Buffy Coat 400 DSP con un volume di eluizione di 400 µl. Le barre del grafico mostrano la resa assoluta del DNA con deviazione standard.

Sangue virale

Sono stati condotti studi di hit rate diluendo il materiale standard OMS CMV pre-quantificato in sangue intero umano CMV-negativo. È stato osservato un tasso di rilevamento del 100% per i campioni con cariche virali di 90 UI di CMV per millilitro (Tabella 1).

Tabella 1. Sensibilità dell'applicazione QIAasympyony DSP Virus Blood

CMV (UI/ml)	Replicati	Successi	(%) successo
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

Il sangue intero umano è stato raccolto da un donatore sano CMV-negativo in provette BD K2E e arricchito con materiale standard OMS CMV utilizzando diversi titoli. Il DNA virale è stato purificato utilizzando il QIAasympyony DSP DNA Mini Kit e il protocollo Virus Blood 200 DSP con un volume di eluizione di 60 µl. Gli eluiti sono stati analizzati con un esame real-time PCR per CMV.

Tessuto e tessuto FFPE

Resa del DNA

Le prestazioni dell'applicazione QIASymphony DSP DNA per tessuti FFPE sono state valutate utilizzando 6 repliche di 1–4 sezioni FFPE da 10 µm di milza umana appena tagliata. L'estrazione del DNA è stata eseguita con il QIASymphony DSP DNA Mini Kit in combinazione con il protocollo DSP a basso contenuto di tessuto. La deparaffinazione e la lisi sono state eseguite mediante pretrattamento con xilene/etanolo. Il DNA è stato eluito in 50 µl di tampone di eluizione e la resa del DNA è stata valutata mediante analisi spettroscopica (Figura 4).

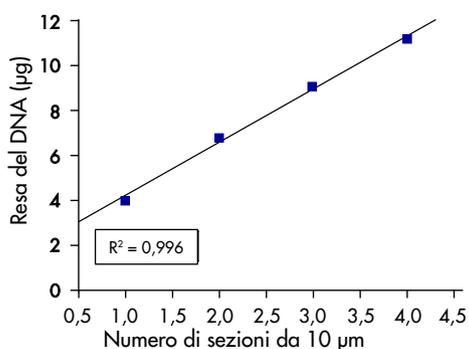


Figura 4. Correlazione tra la resa di DNA e il numero di sezioni di tessuto FFPE. Sei replicati di 1–4 sezioni di tessuto, FFPE da 10 µm di milza umana sono stati deparaffinati mediante pretrattamento con xilene/etanolo. L'estrazione del DNA è stata eseguita sul QIASymphony SP con il QIASymphony DSP DNA Mini Kit in combinazione con il protocollo DSP a basso contenuto di tessuto e un volume di eluizione di 50 µl.

Analisi dello stato mutazionale dei biomarker mediante real-time PCR

L'analisi dello stato mutazionale dei biomarker è stata eseguita con il DNA estratto dalle sezioni FFPE di colon umano e con il DNA estratto da campioni di tessuto polmonare umano.

Per l'estrazione del DNA dai campioni di tessuto FFPE sono state utilizzate 3 sezioni da 10 µm di colon umano per la preparazione dei campioni. L'estrazione del DNA è stata eseguita con la Deparaffinization Solution come pretrattamento e il protocollo DSP a basso contenuto di tessuto in combinazione con un volume di eluizione di 100 µl. L'analisi mutazionale del biomarcatore KRAS è stata eseguita utilizzando un esame real-time PCR per la rilevazione di KRAS in conformità al manuale dell'esame. I valori C_T dell'esame di controllo sono rientrati nell'intervallo definito e l'analisi di rilevamento della mutazione ha rivelato una sostituzione aminoacidica nel codone 12, dimostrata da un valore ΔC_T value of 4,17, inferiore al valore di cut-off definito pari a 8 per il rilevamento di una mutazione 12SER (Tabella 2).

Tabella 2. Risultati dell'analisi mutazionale del biomarker KRAS nel tessuto FFPE

Campione	Reazione	C _T target	C _T controllo interno	ΔC _T *
Controllo senza template	Controllo	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	-
Standard	Controllo	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
Tessuto FFPE (colon umano)	Controllo	24,94	31,98	-
	12ALA	n/a	32,42	-
	12ASP	n/a	32,73	-
	12ARG	n/a	33,05	-
	12CYS	n/a	32,74	-
	12SER	29,11	32,34	4,17
	12VAL	n/a	32,81	-
	13ASP	n/a	33,20	-

* $\Delta C_T = M C_T - C C_T$, dove M indica la mutazione e C il controllo; n.d. non determinato.

Per l'estrazione del DNA da campioni di tessuto congelato sono stati utilizzati 25 mg di polmone umano per la preparazione dei campioni utilizzando il protocollo DSP ad alto contenuto di tessuto e un volume di eluizione di 200 μ l. L'analisi mutazionale del biomarcatore EGFR è stata eseguita utilizzando un esame real-time PCR per EGFR. L'analisi del controllo e la rilevazione delle mutazioni sono state eseguite come descritto nel manuale dell'esame. I risultati hanno rivelato una delezione nel gene EGFR, come dimostra un valore ΔC_T pari a 2,47, che è inferiore al valore cut-off definito per l'individuazione di una mutazione, ossia 12 (Tabella 3).

Tabella 3. Risultati dell'analisi mutazionale del biomarker EGFR nel tessuto congelato

Campione	Reazione	C _T target	C _T controllo interno	ΔC _T *
Controllo senza template	Controllo	0,00	31,71	-
	T790M	0,00	32,36	-
	Delezioni	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	-
Standard	Controllo	28,78	31,05	-
	T790M	30,08	31,13	1,30
	Delezioni	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
Tessuto (polmone umano)	Controllo	25,76	31,23	-
	T790M	n/a	31,99	-
	Delezioni	28,23	30,99	2,47
	L858R	n/a	31,33	-
	L861Q	n/a	31,98	-
	G719X	n/a	32,06	-
	S768I	n/a	31,88	-
	Ins	n/a	31,62	-

* $\Delta C_T = M C_T - C C_T$, dove M indica la mutazione e C il controllo; n.d. non determinato.

Ripetibilità e riproducibilità

Sangue DNA

L'estrazione del DNA è stata eseguita utilizzando il protocollo Blood 200 DSP con un volume di eluizione di 200 µl. La ripetibilità è stata valutata da un unico operatore che ha eseguito 3 sessioni di analisi indipendenti (con 96 campioni ciascuna) in 3 diverse giornate, comprendente ciascuna 4 lotti da 24 campioni (Tabelle 4 e Tabella 5).

La riproducibilità è stata valutata da 3 diversi operatori che hanno eseguito 3 sessioni di analisi indipendenti (con 96 campioni ciascuna) in 3 diverse giornate, su diversi strumenti QIASymphony SP, comprendente ciascuna 4 lotti da 24 campioni (Tabelle 6 e Tabella 7).

Tabella 4. Risultati della valutazione della ripetibilità

Ciclo	Lotto	n	Resa media del DNA (µg)	DS	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
Totale	-	288	4,96	-	-

n, numero di replicati; DS, deviazione standard; CV, coefficiente di variazione.

Tabella 5. Dati di precisione relativi alla valutazione della ripetibilità

	DS	CV
Lotto vs. lotto della stessa sessione	0,25	4,95
Precisione di ripetizione generale	0,26	5,18

SD, deviazione standard; CV, coefficiente di variazione.

Tabella 6. Risultati della valutazione della riproducibilità

Ciclo	Lotto	n	Resa media del DNA (µg)	DS	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
Totale	-	288	5,38	-	-

n,, numero di replicati; DS, deviazione standard; CV, coefficiente di variazione.

Tabella 7. Dati di precisione relativi alla valutazione della riproducibilità

	DS	CV
Lotto vs. lotto della stessa sessione	0,25	4,73
Precisione di ripetizione generale	0,38	7,03

SD, deviazione standard; CV, coefficiente di variazione.

Confronto di prestazioni

Sangue DNA

È stato eseguito un confronto di prestazioni fra il sistema QIAAsymphony DSP DNA Blood, il sistema EZ1® DSP DNA Blood e la procedura di preparazione manuale con il QIAamp® DNA Blood Mini Kit. Il DNA è stato purificato da diversi campioni di sangue e analizzato per la resa del DNA (Figura 5).

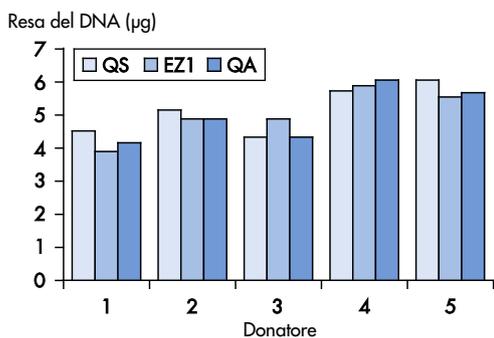


Figura 5. Confronto delle rese del DNA fra diversi di sistemi di purificazione del DNA del sangue. Il sangue intero è stato raccolto da 5 donatori sani in provette BD K2E. Per tutti i metodi sono stati utilizzati volumi iniziali dei campioni di 200 µl e volumi di eluzione di 200 µl. QS, QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit e protocollo Blood 200 DSP; EZ1, EZ1 Advanced XL con uso dell'EZ1 DSP DNA Blood Kit; QA, QIAamp DNA Blood Mini Kit. Le barre del grafico mostrano la resa assoluta del DNA per ogni campione.

Tessuto e tessuto FFPE

Le prestazioni del QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit sono state confrontate con le prestazioni del QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit manuale e con le prestazioni del QIAamp DSP DNA Mini Kit utilizzando come materiale campione rispettivamente tessuto FFPE e tessuti freschi e congelati. Sono state eseguite simultaneamente la preparazione manuale e automatizzata e la quantificazione delle rese del DNA. La Figura 6 illustra le rese del DNA in seguito ad estrazione da campioni di tessuto fresco/congelato e di tessuto FFPE utilizzando il QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit, il QIAamp DSP DNA Mini Kit (tessuto) e il QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (tessuto FFPE).

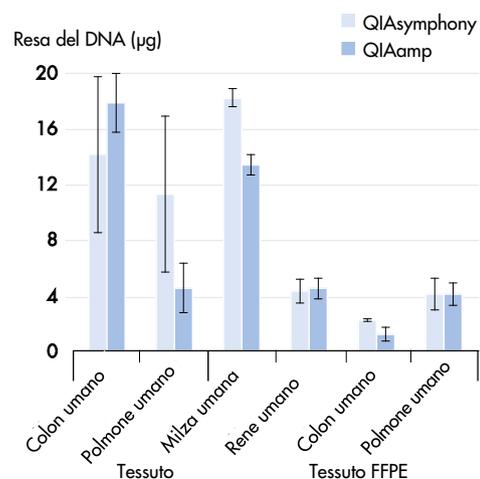


Figura 6. Estrazione del DNA da campioni di tessuto e tessuto FFPE. Per i campioni di tessuto freschi/congelati, polmone umano e colon sono stati sezionati in 6 porzioni da 25 mg ciascuno. Tre porzioni di ciascun tipo di tessuto sono stati usati per la preparazione dei campioni utilizzando il QIAAsymphony SP in combinazione con il protocollo DSP ad alto contenuto di tessuto. L'estrazione del DNA dai restanti campioni è stata eseguita con il QIAamp DSP DNA Mini Kit. Il DNA è stato eluito in 200 µl e la resa del DNA è stata calcolata mediante analisi spettroscopica. Per l'estrazione del DNA dal tessuto FFPE, sono stati preparati 12 replicati contenenti 3 sezioni di tessuto FFPE da 10 µm ottenuti da vari organi umani. Sei campioni sono stati utilizzati per la preparazione dei campioni utilizzando il QIAAsymphony SP in combinazione con il pretrattamento a base di Deparaffinization Solution e il protocollo DSP a basso contenuto di tessuto. L'estrazione del DNA dai restanti campioni è stata eseguita con il QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. Il DNA è stato eluito in 50 µl e la resa del DNA è stata calcolata mediante analisi spettroscopica. Le barre del grafico mostrano la resa assoluta del DNA con deviazione standard.

Intervallo di ingresso/uscita di campionamento

Sangue DNA

Sono stati confrontati diversi intervalli di ingresso del campione e di uscita dell'eluito per l'applicazione del DNA del sangue utilizzando campioni di donatori di sangue con un intervallo di conteggio WBC compreso tra $5,0$ e $8,0 \times 10^6$ cellule/ml.

Il sangue intero è stato raccolto da 8 donatori sani in provette BD K2E. Il DNA è stato purificato da 6 replicati, ciascuno utilizzando il QIAasymphony DSP DNA Mini/Midi Kit e il protocollo DNA blood 200 DSP con volume di eluizione di $200 \mu\text{l}$, DNA blood 400 DSP con volume di eluizione di $400 \mu\text{l}$ e il protocollo DNA blood 1000 DSP con volume di eluizione di $500 \mu\text{l}$ (Figura 7).

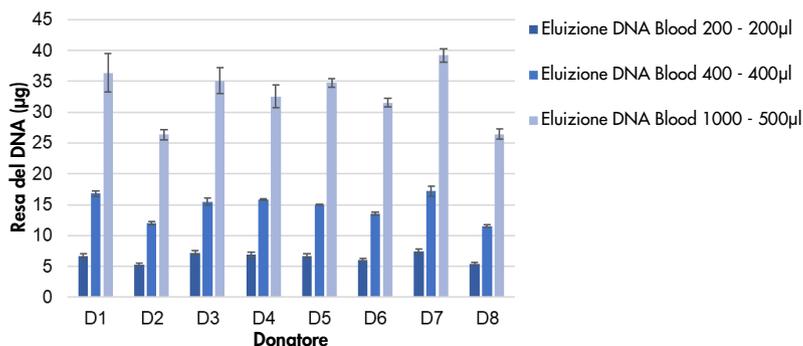


Figura 7. Confronto tra diversi ingressi di campioni e volumi di eluizione per i sistemi di purificazione del DNA del sangue. Il sangue intero è stato raccolto da 8 donatori sani in provette BD K2E. L'estrazione del DNA è stata eseguita utilizzando il protocollo DNA Blood 200 con volume di eluizione di $200 \mu\text{l}$, il protocollo DNA Blood 400 con volume di eluizione di $400 \mu\text{l}$ e il protocollo DNA Blood 1000 con volume di eluizione di $500 \mu\text{l}$. La resa del DNA è stata determinata mediante analisi spettroscopica. Le barre mostrano la resa assoluta di DNA (valore medio con deviazione standard) per ciascun donatore.

Sangue virale

Il sangue intero è stato raccolto da 3 donatori sani con una conta di globuli bianchi compresa tra $4,0$ e $11,0 \times 10^6$ cellule/ml, in provette BD K2E e arricchito con materiale standard CMV (titolo $3,7 \log$ copie/ml). Il DNA virale è stato purificato da 7 replicati, utilizzando per ciascuno il QIAasymphony DSP DNA Mini Kit e il protocollo Virus Blood 200 DSP con 4 diversi volumi di eluizione (Figura 8).

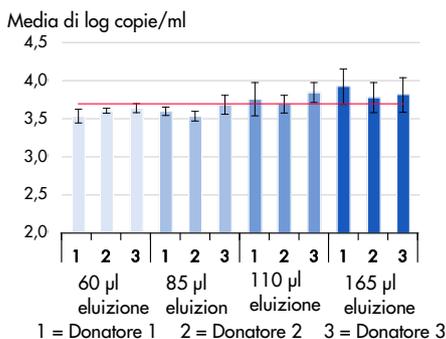


Figura 8. Confronto della quantificazione del DNA virale per diversi volumi di eluizione. Gli eluiti dei campioni di ciascun donatore e il volume di eluizione (60 , 85 , 110 e $165 \mu\text{l}$) sono stati analizzati con l'esame CMV real-time PCR. La linea rossa rappresenta il titolo target e le barre del grafico mostrano la media di log copie per millilitro con deviazione standard.

Stabilità degli eluiti

Nota: la stabilità degli eluiti dipende in larga misura da vari fattori ed è correlata alla specifica applicazione a valle. È stata stabilita per i QIASymphony DSP Mini e Midi Kit in combinazione con applicazioni a valle esemplari. È responsabilità dell'utente consultare le istruzioni per l'uso della specifica applicazione a valle utilizzata nel proprio laboratorio e/o convalidare l'intero flusso di lavoro per stabilire le condizioni di conservazione adeguate.

Sangue DNA e buffy coat

La stabilità degli eluiti per l'applicazione del DNA del sangue è stata testata utilizzando eluiti di cicli QS eseguiti con il protocollo DNA Blood 200 con volume di eluizione di 200 µl e con il protocollo DNA Blood 1000 con volume di eluizione di 500 µl. Gli eluiti sono stati conservati in provette Sarstedt da 2 ml a temperatura ambiente, 2–8°C, -20°C e -80°C. La resa e la purezza del DNA sono state determinate mediante analisi spettroscopica. L'integrità del DNA è stata analizzata mediante elettroforesi su gel e un esame PCR a lungo raggio. (Figura 9).

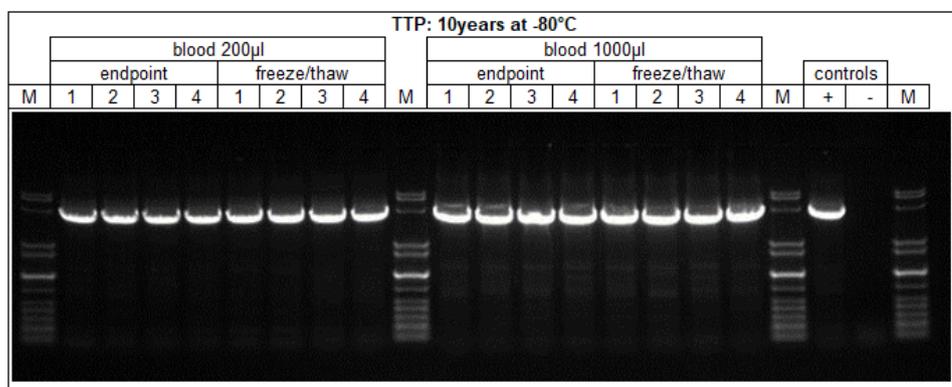


Figura 9. Stabilità dell'eluito per DNA Blood. Il DNA è stato purificato utilizzando i protocolli DNA Blood 200 µl e 1000 µl. Gli eluiti sono stati conservati a -80°C in provette Sarstedt da 2 ml. Sono state analizzati quattro replicati. L'integrità del DNA è stata testata mediante PCR a lungo raggio. Le figure riportano i risultati dopo un periodo di conservazione di 10 anni. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder.

La stabilità dell'eluito per l'applicazione buffy coat è stata testata utilizzando eluiti provenienti da cicli QS eseguiti con il protocollo BC 400 µl e un volume di eluizione di 200 µl. Gli eluiti sono stati conservati in provette Sarstedt da 2 ml e in rack di microprovette di eluizione a temperatura ambiente, 2–8°C, -20°C e -80°C. Inoltre, gli eluiti sono stati sottoposti a test di congelamento/scongelo per un massimo di 3 cicli (Figura 10). La resa e la purezza del DNA sono state determinate mediante analisi spettroscopica. L'integrità del DNA è stata analizzata mediante elettroforesi su gel e un esame di PCR a lungo raggio (reazione da 50 µl).

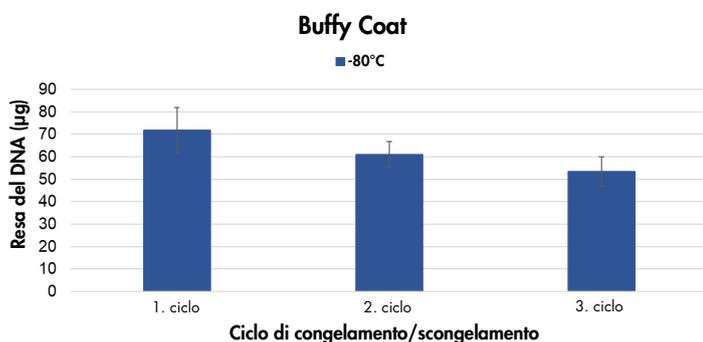


Figura 10. Cicli di congelamento/scongelo dell'eluito per il buffy coat. Il DNA è stato purificato utilizzando il protocollo DNA BC 400 µl. Il buffy coat è stato generato da sangue EDTA. Gli eluiti sono stati conservati in provette Sarstedt da 2 ml. La resa del DNA è stata determinata nei momenti del test utilizzando lo stesso eluito in 3 cicli di congelamento/scongelo. La resa del DNA è stata determinata mediante analisi spettroscopica. Le barre del grafico mostrano la resa assoluta del DNA (valore medio con deviazione standard).

Sangue virale

La stabilità dell'eluato per l'applicazione Virus Blood è stata testata utilizzando eluati di cicli QS eseguiti con il protocollo Virus Blood 200 con un volume di eluizione di 60 µl. Come campione è stato utilizzato sangue K₂ EDTA con standard CMV commerciale (titolo 2,7 log copie/ml). Gli eluati sono stati conservati in provette Sarstedt da 2 ml a 2-8°C, -20°C e -80°C. Gli eluati sono stati analizzati con un esame real-time CMV (Figura 11). Di seguito vengono mostrati i risultati di diversi momenti del test.

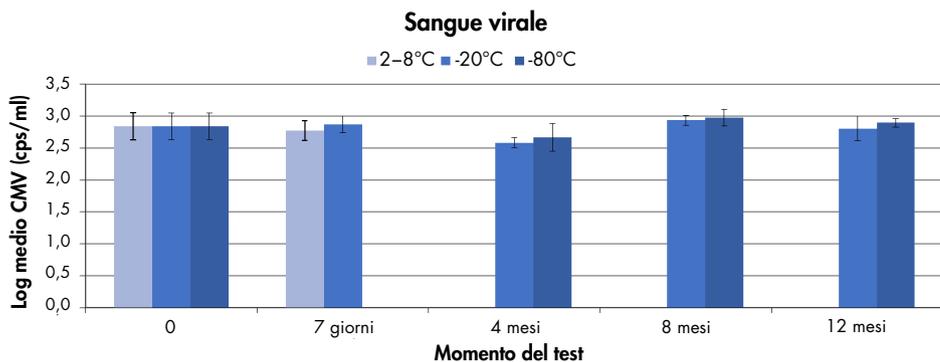


Figura 11. Stabilità dell'eluato per l'applicazione Virus Blood. I campioni di sangue in EDTA addizionati con lo standard commerciale del CMV sono stati purificati con il protocollo Virus Blood 200. Gli eluati sono stati conservati a diverse temperature in rack per microprovette di eluizione e in provette Sarstedt da 2 ml. Per ogni momento del test sono stati analizzati 4 replicati. Le barre mostrano il titolo di CMV (valore log medio con deviazione standard).

Tessuto

La stabilità dell'eluato per l'applicazione tissutale è stata testata utilizzando il protocollo Tissue HC 200 µl e un volume di eluizione di 200 µl. Come materiale campione è stato utilizzato fegato bovino fresco. Gli eluati sono stati conservati in provette Sarstedt da 2 ml e in rack per microprovette di eluizione a temperatura ambiente, 2-8°C, -20°C e -80°C. La resa e la purezza del DNA sono state determinate mediante analisi spettroscopica. (Figura 12). L'integrità del DNA è stata analizzata mediante elettroforesi su gel.

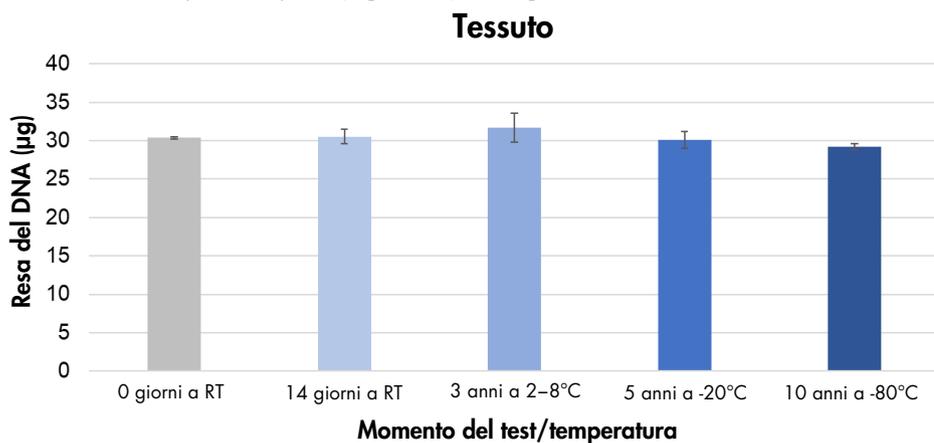
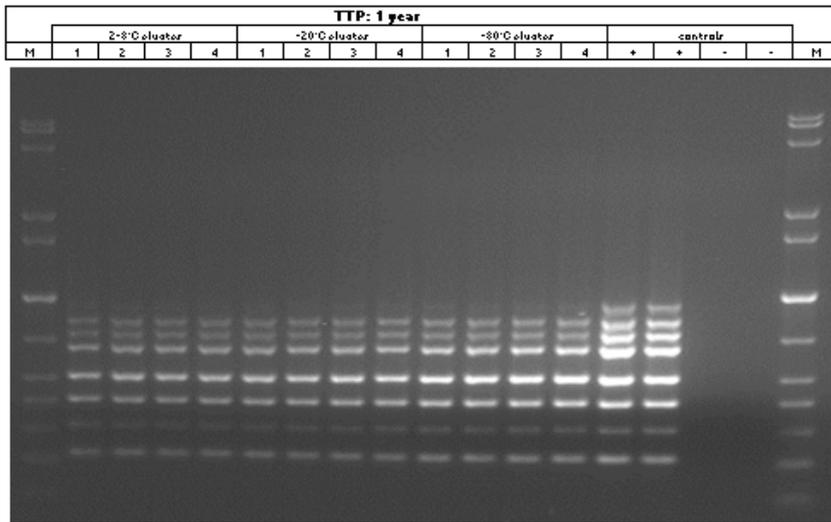


Figura 12. Stabilità dell'eluato per Tissue. Il DNA è stato purificato utilizzando il protocollo DNA Tissue HC con un volume di eluizione di 200 µl. Come materiale campione è stato utilizzato fegato bovino fresco. Gli eluati sono stati conservati a diverse temperature in rack per microprovette di eluizione e in provette Sarstedt da 2 ml. Per ogni momento del test sono stati analizzati 4 replicati. La resa del DNA è stata determinata mediante analisi spettroscopica. Le barre del grafico mostrano la resa assoluta del DNA (valore medio con deviazione standard).

Tessuto FFPE

La stabilità dell'eluito per l'applicazione su tessuti FFPE è stata testata utilizzando il protocollo Tissue LC 200 µl e un volume di eluizione di 100 µl. Come materiale campione è stato utilizzato tessuto umano commerciale FFPE. Gli eluiti sono stati conservati in provette Sarstedt da 2 ml e in rack di microprovette di eluizione a temperatura ambiente, 2-8°C, -20°C e -80°C. Gli eluiti sono stati analizzati con un esame PCR inhouse 8-plex umano (Figura 13). Di seguito, vengono riportati i risultati di due momenti del test.

A:



B:

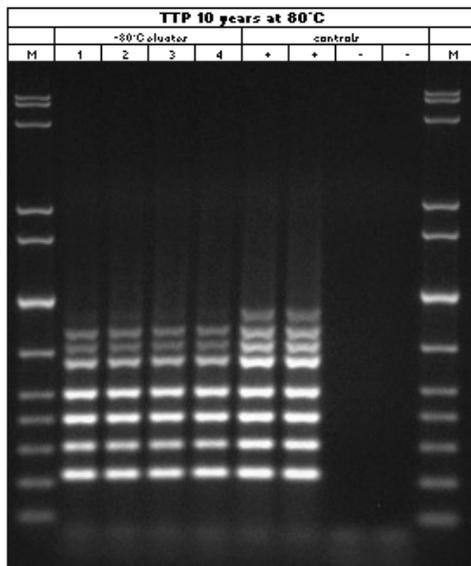


Figura 13. Stabilità dell'eluito per tessuti FFPE. Il DNA è stato purificato utilizzando il protocollo DNA Tissue LC. Come materiale campione è stato utilizzato tessuto commerciale FFPE. Gli eluiti sono stati conservati a diverse temperature in rack per microprovette di eluizione e in provette Sarstedt da 2 ml. Per ogni momento del test sono stati analizzati 4 replicati. Gli eluiti sono stati analizzati con un esame PCR inhouse 8-plex umano.

Sostanze interferenti

L'influenza delle sostanze inibitorie, che possono essere presenti nel sangue intero, sulle performance dell'applicazione per DNA Blood, Virus Blood e Tissue è stata analizzata con l'aggiunta delle seguenti sostanze:

Tabella 8. Sostanze potenzialmente interferenti analizzate per le diverse applicazioni

Sostanze interferenti	Concentrazione	Sangue	Sangue virale	Tessuto
Bilirubina	200 mg/l	√	√	√
Emoglobina	200 g/l	√	√	
Trigliceridi	30 g/l	√	√	√
Proteina	120 g/l	√	√	√

Nota: "√" indica quali materiali campione sono stati analizzati per la rispettiva sostanza potenzialmente interferente.

Per quanto riguarda l'emoglobina (200 g/l) e le proteine (120 g/l), sono stati determinati i livelli nel campione di sangue ed è stata aggiunta un'ulteriore quantità di emoglobina e proteine per raggiungere le concentrazioni indicate, rispettivamente 200 o 120 g/l. Per quanto riguarda la bilirubina (200 mg/l) e i trigliceridi (30 g/l), è stata aggiunta la quantità totale di ogni sostanza ai campioni per raggiungere le concentrazioni indicate.

Per i tessuti, la quantità totale di ciascuna sostanza è stata aggiunta direttamente ai lisati, senza determinare la concentrazione di bilirubina, trigliceridi o proteine del campione di tessuto utilizzato.

Eventuali sostanze potenzialmente interferenti (ad esempio, farmaci) e la relativa concentrazione sono molto specifiche per l'applicazione a valle e per eventuali trattamenti medici precedenti di un paziente e devono essere analizzate durante la verifica di tale applicazione a valle utilizzando i QIASymphony DSP DNA Mini e Midi Kit.

Nota: i test sono stati eseguiti utilizzando applicazioni a valle esemplari per valutare la qualità degli acidi nucleici estratti. Tuttavia, le varie applicazioni a valle possono avere requisiti diversi per quanto riguarda la purezza (cioè l'assenza o la concentrazione di potenziali sostanze interferenti), quindi l'identificazione e il test delle sostanze rilevanti e delle rispettive concentrazioni devono essere stabiliti come parte dello sviluppo dell'applicazione a valle per qualsiasi flusso di lavoro che coinvolga i QIASymphony DSP Mini e Midi Kit.

Nota: tenere presente che durante il processo di sviluppo del QIASymphony DSP DNA Midi Kit non sono state osservate indicazioni sul fatto che l'eparina abbia un impatto negativo sulle prestazioni. Tuttavia, la norma ISO 20186-2:2019(E) afferma che l'eparina presente nelle provette di raccolta del sangue può compromettere la purezza degli acidi nucleici isolati e un eventuale carryover negli eluiti potrebbe determinare inibizioni in alcune applicazioni a valle. Pertanto, è responsabilità dell'utente convalidare se l'eparina ha un'influenza negativa sul proprio flusso di lavoro.

Sangue DNA e buffy coat

Per le applicazioni DNA Blood i test sono stati eseguiti utilizzando il protocollo DSP DNA 1000, che comprende il volume di ingresso del campione più elevato, utilizzando volumi di eluizione di 200 e 500 µl.

Gli eluiti sono stati analizzati mediante analisi spettroscopica per verificare la resa e la purezza del DNA. La compatibilità della PCR è stata analizzata utilizzando un esame real-time PCR e un esame endpoint PCR.

Nessuna delle sostanze elencate nella Tabella 9 è in grado di interferire; tuttavia, i campioni ematici con elevate concentrazioni di trigliceridi (>30 g/l) possono comportare una riduzione della resa di gDNA.

Sangue virale

Per l'applicazione Virus Blood, i test sono stati eseguiti utilizzando il protocollo DSP Virus Blood 200 con un volume di eluizione di 60 µl. I campioni di sangue CMV-negativi sono stati addizionati a 500 copie/ml (bassa concentrazione) e a 1×10^4 copie/ml (alta concentrazione, Figura 14) di uno standard CMV commerciale.

Gli eluati sono stati analizzati con un esame real-time PCR per CMV.

Nessuna delle sostanze elencate nella Tabella 9 è in grado di interferire; tuttavia, i campioni ematici con alte concentrazioni di trigliceridi (>30 g/l) possono determinare una ridotta purificazione del DNA virale.

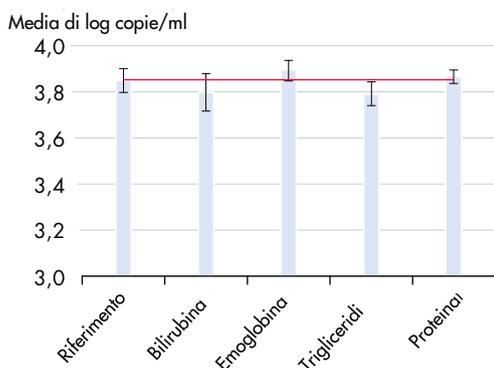


Figura 14. Test delle sostanze inibitorie. Il sangue intero è stato raccolto da 1 donatori sani in provette BD K2E e arricchito con materiale standard CMV (titolo 4,0 log copie/ml). Sono stati testati cinque campioni aggiungendo potenziali inibitori e il DNA virale è stato purificato da 4 replicati di ciascun campione utilizzando il QIA Symphony DSP DNA Mini Kit e il protocollo Virus Blood 200 DSP con un volume di eluizione di 165 µl. Gli eluati sono stati analizzati con un esame real-time PCR per CMV. La linea rossa rappresenta il titolo stabilito per i campioni di riferimento, che non sono stati arricchiti con sostanze inibitorie, e le barre del grafico mostrano la media di log copie per millilitro con deviazione standard.

Tissue

Per i tessuti di DNA (freschi e congelati), i test sono stati eseguiti utilizzando il protocollo DSP DNA HC, con un volume di eluizione di 200 µl.

Gli eluati sono stati analizzati mediante analisi spettroscopica per verificare la resa e la purezza del DNA. La compatibilità della PCR è stata testata utilizzando un esame real-time PCR.

Nessuna delle sostanze elencate nella Tabella 9 è stata ritenuta tale da avere un impatto negativo sulla preparazione dei campioni.

Tessuto FFPE

Per i tessuti FFPE, i test sono stati eseguiti utilizzando il protocollo DSP DNA LC, con un volume di eluizione di 50 µl.

Le sostanze (vedi Tabella 9) sono state aggiunte direttamente al lisato.

Tabella 9. Sostanze potenzialmente interferenti analizzate per le diverse applicazioni

Sostanze interferenti	Concentrazione nel lisato
Xilene	Fino all'11%
Etanolo	Fino all'11%
Deparaffinization Solution	Fino all'11%
Paraffina	Sezione da 0,1 µM

Gli eluiti sono stati analizzati mediante analisi spettroscopica per verificare la resa e la purezza del DNA. La compatibilità della PCR è stata testata utilizzando una real-time PCR e un esame inhouse PCR 8-plex umano.

Nessuna delle sostanze elencate nella Tabella 9 è stata ritenuta tale da avere un impatto negativo sulla preparazione dei campioni.

Contaminazione crociata

Sangue DNA

Il rischio di contaminazione crociata dell'applicazione QIASymphony DNA Blood è stato analizzato eseguendo quattro serie di 96 campioni sullo strumento QIASymphony SP con lotti alternati a scacchiera (campioni positivi e negativi alternati), interrotti da lotti completamente negativi. Come sistema modello è stato utilizzato sangue maschile (contenente una conta di globuli bianchi $\geq 1,0 \times 10^7$ cellule/ml e sangue femminile contenente una conta di globuli bianchi compresa tra $4,0 \times 10^6$ e 9×10^6 cellule/ml). La preparazione del campione è stata eseguita utilizzando il protocollo Blood 1000 µl, che comprende il volume di campione più elevato. Una potenziale contaminazione dei campioni negativi femminili durante i cicli di estrazione è stata valutata con la successiva analisi degli eluiti mediante una real-time PCR per il cromosoma Y.

Non è stata rilevata alcuna contaminazione crociata tra campioni, tra lotti e lotti, o carryover da un ciclo all'altro.

Simboli

Nel presente documento compaiono i seguenti simboli. Per un elenco completo dei simboli utilizzati nelle istruzioni per l'uso o sulla confezione e sull'etichettatura, consultare il manuale.

Simbolo	Definizione del simbolo
	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
Rn	R sta per revisione delle istruzioni per l'uso e n è il numero di revisione
	Produttore

Cronologia delle revisioni

Revisione	Descrizione
R1, giugno 2022	Versione 2, revisione 1 <ul style="list-style-type: none">• Aggiornamento alla versione 2 per la conformità a IVDR• Aggiunta di paragrafi per le sostanze interferenti, la contaminazione incrociata, la stabilità dell'eluato e la compatibilità con le applicazioni a valle.

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per le clausole di esclusione della responsabilità specifiche dei prodotti, 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®, QIASymphony®, QIAamp®, EZ1®, UltraRun® (QIAGEN Group); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.). 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-3029-D01-001 © 2022 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

