



Giugno 2022

# Istruzioni per l'uso (caratteristiche delle prestazioni) del QIASymphony<sup>®</sup> DSP Circulating DNA Kit

Versione 2



Per uso diagnostico in vitro

Per l'uso con il QIASymphony DSP Circulating DNA Kit



937556



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Germania

R1

Le caratteristiche delle prestazioni sono disponibili in formato elettronico nella scheda delle risorse della pagina prodotti all'indirizzo [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Introduzione generale

Il sistema QIASymphony DSP Circulating DNA è un test in vitro pronto all'uso per la purificazione qualitativa di DNA libero circolante (ccfDNA) da plasma e urina umani.

Il QIASymphony DSP Circulating DNA Kit è studiato per essere utilizzato esclusivamente in combinazione con lo strumento QIASymphony SP.

Il QIASymphony DSP Circulating DNA Kit fornisce reagenti per procedure completamente automatizzate e simultanee di purificazione di ccfDNA da un'ampia gamma di tipologie di plasma umano (con stabilizzatori del profilo del ccfDNA, ad esempio, Cell-Free DNA BCT® Streck®, come pure senza stabilizzatori del profilo del ccf DNA, ad esempio provette con EDTA) e urina umana (con e senza stabilizzatori di profilo del ccfDNA). Tuttavia, le caratteristiche delle prestazioni non sono state accertate per ogni provetta di prelievo ematico e devono essere convalidate dall'utente.

Il ccfDNA purificato è compatibile con un'ampia gamma di applicazioni a valle, come processi PCR, esame di quantificazione basati sulla fluorescenza o NGS.

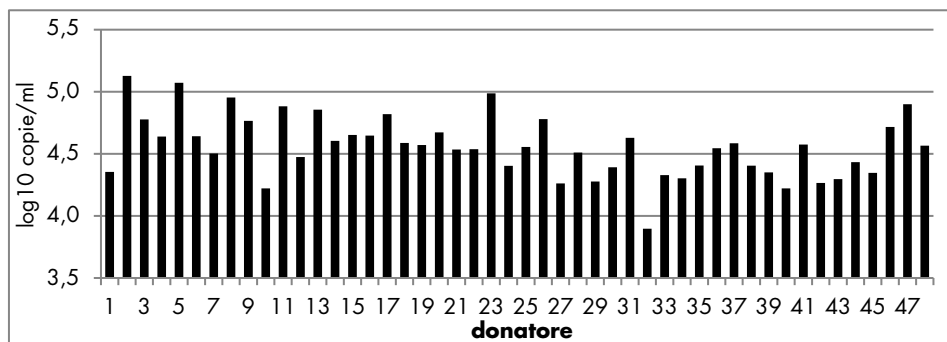
Il QIASymphony SP esegue tutte le fasi della procedura di purificazione. In una singola sessione possono essere processati fino a 96 campioni, in lotti di 24 campioni. I campioni di urina possono richiedere un pretrattamento manuale.

Nota: le caratteristiche delle prestazioni dipendono in larga misura da vari fattori e si riferiscono alla specifica applicazione a valle. È stato determinato per il QS DSP Circulating DNA Kit in combinazione con applicazioni a valle esemplari. Tuttavia, poiché i metodi per isolare gli acidi nucleici dai campioni biologici sono utilizzati come front-end per più applicazioni a valle, i parametri di prestazione, ad esempio la contaminazione incrociata e la precisione del processo, devono essere determinati 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.

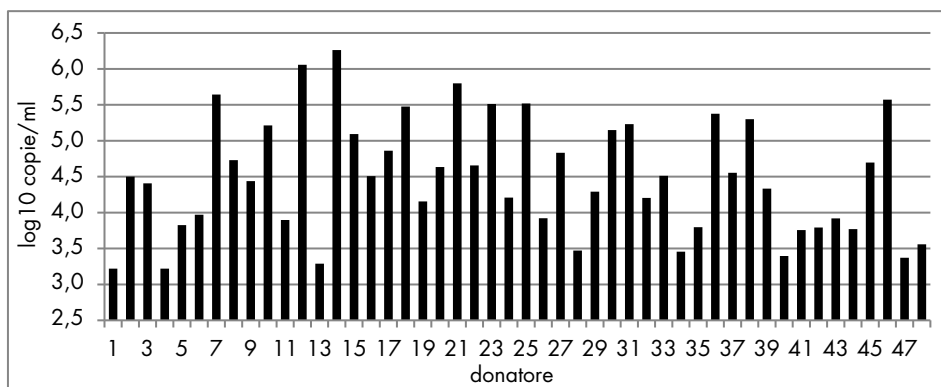
## Prestazioni di base

Le prestazioni di base di QIASymphony DSP Circulating DNA Kit sono state valutate utilizzando 48 singoli donatori per l'estrazione di ccfDNA da 4 ml di plasma Streck, nonché da 4 ml di urina stabilizzata. La resa del ccfDNA è stata determinata tramite esame real-time PCR interno per la sequenza codificante l'RNA ribosomiale 18S.

La differenza delle rese ( $\log_{10}$  copie/ml) riportate in Figura 1 (4 ml di plasma) e Figura 2 (4 ml di urina) riflette le forti concentrazioni donatore-dipendenti del ccfDNA tipicamente osservate nello stesso volume del rispettivo campione.



**Figura 1. Resa del ccfDNA da plasma di 48 singoli donatori.** La donazione di sangue da parte di 48 singoli donatori è stata fatta in Cell-Free DNA BCT (Streck). Il ccfDNA è stato estratto da 4 ml di plasma utilizzando il QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. La resa del ccfDNA è stata quantificata utilizzando un esame real-time PCR reale interno per la sequenza codificante l'RNA 18S. I risultati sono stati calcolati come copie target per millilitro di plasma immesso.



**Figura 2. Resa del ccfDNA da urina di 48 singoli donatori.** L'urina raccolta da 48 singoli donatori è stata stabilizzata utilizzando Cell-Free DNA Urine Preserve® (Streck). Il ccfDNA è stato estratto da 4 ml di urina utilizzando il QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit. La resa del ccfDNA è stata quantificata utilizzando un esame real-time PCR reale interno per la sequenza codificante l'RNA 18S. I risultati sono stati calcolati come copie target per millilitro di urina immesso.

## Precisione del processo

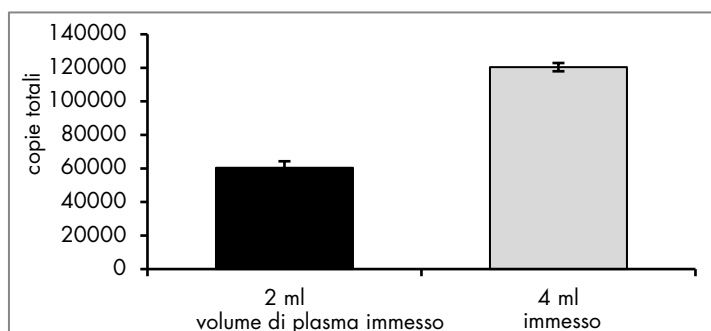
Sono stati determinati i coefficienti di variazione (CV) per l'estrazione di ccfDNA umano da plasma trattato con EDTA. Per l'analisi di precisione, il ccfDNA è stato quantificato tramite esame real-time PCR interno per la sequenza codificante l'RNA ribosomiale 18S. In totale, con il QIAasymphony sono stati eseguiti 10 processi, ciascuno in 4 lotti (8 replicati per lotto). I dati di precisione sono riportati nella Tabella 1.

**Tabella 1. Analisi delle stime di precisione**

Precisione	CV (%)
Entro lotto	11,67
Ripetibilità	13,14
Precisione intermedia	13,14
Precisione totale	14,12

## Prestazioni equivalenti di protocolli con 2 e 4 ml

Sono state valutate le prestazioni equivalenti di protocolli riguardanti un volume di campione immesso pari a 2 e 4 ml per il QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit utilizzando ccfDNA endogeno estratto da pool di plasma umano trattato con EDTA. In totale, con il QIAasymphony sono stati eseguiti 8 processi indipendenti, ciascuno in 4 lotti con 8 replicati per lotto. L'intervallo lineare della procedura del QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit è stato stabilito per la sequenza codificante l'RNA 18S con un esame real-time PCR interno (Figura 3). Il rapporto di differenza per i protocolli con 2 e 4 ml è indicato nella Tabella 2 (il protocollo di riferimento riguarda un volume di campione immesso di 4 ml).



**Figura 3. Prestazioni equivalenti utilizzando il protocollo per volume di campione immesso di 2 e 4 ml.** L'intervallo lineare del protocollo ccfDNA è stato determinato utilizzando i protocolli con 2 e 4 ml. La resa del ccfDNA è stata quantificata utilizzando un esame real-time PCR interno per la sequenza codificante l'RNA 18S. I risultati sono stati calcolati come copie target per protocollo.

Tabella 2. Differenza tra protocolli con 2 e per 4 ml (N = 256)

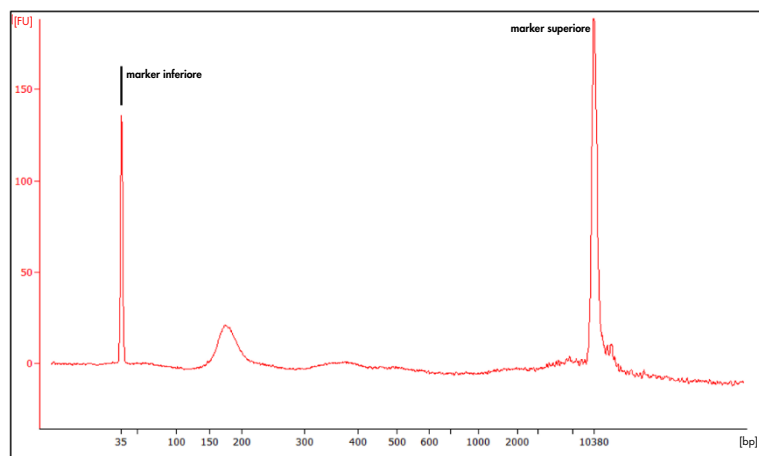
Parametro	Valore
Rapporto stimato della media geometrica in copie/ml calcolate	1,01
Limite inferiore di confidenza al 95%	0,92
Limite superiore di confidenza al 95%	1,11
Precisione totale	14,12

Le prestazioni dei protocolli per un volume di campione immesso di 2 e 4 ml sono equivalenti, misurate in copie per millimetro calcolate.

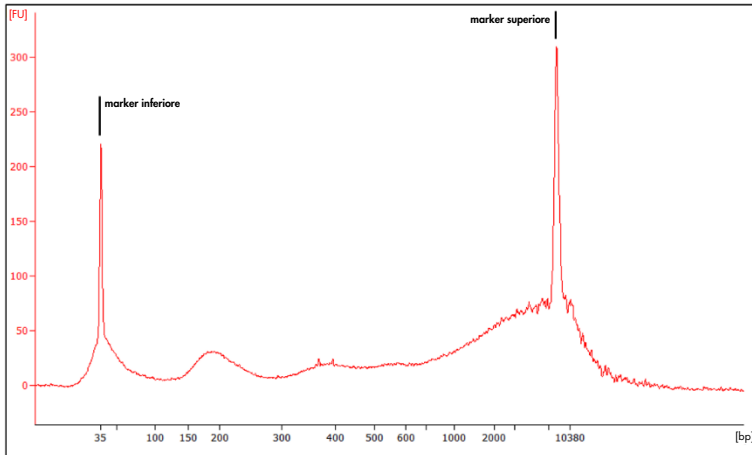
## Distribuzione dimensionale

Per valutare la distribuzione dimensionale dell'uscita campione, è stato estratto ccfDNA da un volume di campione immesso di 4 ml utilizzando il QIASymphony DSP Circulating DNA Kit, poi eluito in 75 µl; 1 µl di eluito è stato quindi sottoposto ad analisi delle dimensioni con il Bioanalyzer Agilent® 2100 utilizzando un chip Agilent High Sensitivity DNA. Sono stati eseguiti in totale 5 replicati indipendenti. Un profilo rappresentativo del DNA è illustrato per il plasma in [Figura 4](#) e per l'urina in [Figura 5](#).

L'elettroferogramma per il plasma in [Figura 4](#) mostra il picco osservato frequentemente a circa 165 bp, compreso tra 145-196 bp, che si trova nel range della lunghezza del DNA presente nel nucleosoma e legato agli istoni. L'elettroferogramma per l'urina in [Figura 5](#) mostra che il picco predominante a circa 160 bp è più ampio, ossia compreso tra circa 145 e 250 bp. Inoltre, per l'urina è presente un secondo picco compreso tra circa 20 e 100 bp (a livello del picco del marker inferiore), indicando una frazione di ccfDNA con grado di frammentazione più elevato. La [Figura 5](#) mostra anche un numero elevato di frammenti di DNA a partire da circa 2 kb. Un'elevata numerosità di tali frammenti di DNA genomico si trova spesso in campioni di urina, molto probabilmente a causa del rilascio di DNA genomico da cellule presenti nell'urina.



**Figura 4. Distribuzione dimensionale di ccfDNA da plasma (profilo Bioanalyzer).** Il ccfDNA è stato estratto da 4 ml di plasma trattato con EDTA utilizzando il QIASymphony DSP Circulating DNA Kit; 1 µl di eluito è stato sottoposto ad analisi con chip Agilent High Sensitivity DNA. Asse X: dimensioni coppie di basi (base pair, bp); asse Y: unità di fluorescenza (fluorescence units, FU).

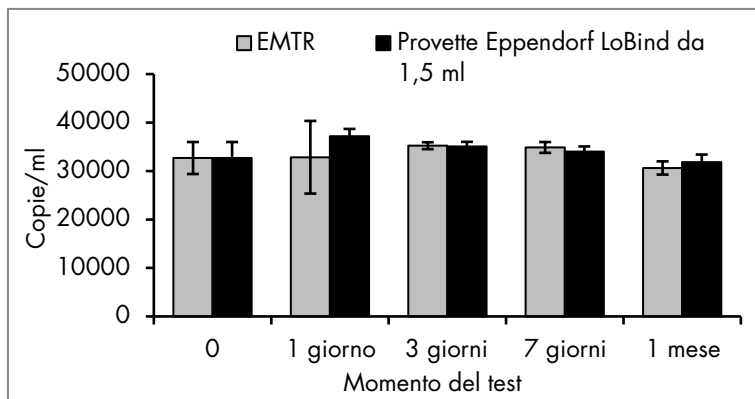


**Figura 5. Distribuzione dimensionale di cfDNA da urina (profilo Bioanalyzer).** Il cfDNA è stato estratto da 4 ml di urina utilizzando il QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit; 1 µl di eluito è stato sottoposto ad analisi con chip Agilent High Sensitivity DNA. Asse X: dimensioni coppie di basi (base pair, bp); asse Y: unità di fluorescenza (fluorescence units, FU).

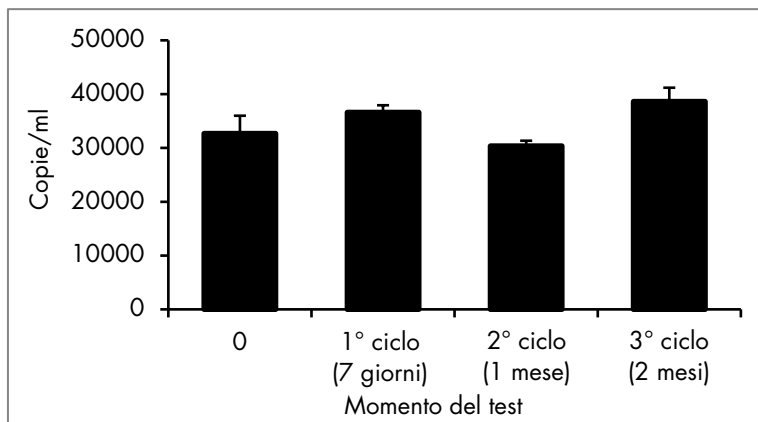
## Stabilità degli eluiti

La stabilità degli eluiti per il QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit è stata valutata utilizzando cfDNA estratto da un pool di plasma umano trattato con EDTA. Gli eluiti sono stati conservati in 2 differenti formati di rack per eluizione: QIAGEN® EMTR (Elution Microtubes CL 96; n. cat. 19588) e provette Safe-Lock con tappo a pressione Eppendorf® LoBind da 1,5 ml. Gli eluiti sono stati analizzati in replicati di 8. La stabilità del DNA in eluiti è stata determinata tramite esame real-time PCR interno per la sequenza codificante l'RNA ribosomiale 18S.

La stabilità degli eluiti a 2–8°C non è stata influenzata dalla durata del periodo di conservazione fino a un mese, né dalla forma di conservazione (Figura 6). La stabilità del DNA in provette LoBind non è stata influenzata dalla conservazione alla temperatura compresa tra –15°C e –30°C, inclusi 3 cicli di congelamento–scongelo dopo 7 giorni, un mese e due mesi (Figura 7).



**Figura 6. Stabilità di cfDNA in eluiti conservati a 2–8°C in 2 formati di provette.** Il cfDNA è stato estratto da plasma trattato con EDTA utilizzando il QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit e conservato a 2–8°C per diversi momenti del test. La resa del cfDNA è stata quantificata utilizzando un esame real-time PCR interno per la sequenza codificante l'RNA 18S. I risultati sono stati calcolati come copie target per millilitro di plasma immesso.



**Figura 7. Stabilità di ccfDNA in eluati conservati a temperatura compresa tra  $-15^{\circ}\text{C}$  e  $-30^{\circ}\text{C}$ , inclusi 3 cicli di congelamento–scongelo.** Il ccfDNA è stato estratto da plasma trattato con EDTA utilizzando il QIASymphony DSP Circulating DNA Kit e conservato a temperatura compresa tra  $-15^{\circ}\text{C}$  e  $-30^{\circ}\text{C}$  in provette Eppendorf LoBind da 1,5 ml. La resa del ccfDNA è stata determinata in 3 momenti del test utilizzando lo stesso eluito in 3 cicli di congelamento–scongelo. La resa del ccfDNA è stata quantificata utilizzando un esame real-time PCR interno per la sequenza codificante l'RNA 18S. I risultati sono stati calcolati come copie target per millilitro di plasma immesso.

## Sostanze interferenti

Plasma e urina umani sono stati addizionati con diverse sostanze potenzialmente interferenti (vedere la Tabella 3) per testare il loro impatto sulle prestazioni di estrazione di ccfDNA del QS DSP Circulating DNA Kit e la conseguente compatibilità con gli esami downstream esemplari. Gli eluati sono stati analizzati con un real-time PCR interno per la sequenza codificante l'RNA 18S e con Qubit® Fluorometer utilizzando un esame dsDNA High Sensitivity.

**Tabella 3. Concentrazioni nel test di sostanza potenzialmente interferenti**

Sostanze interferenti	Plasma	Urina
Bilirubina	200 mg/litro*	200 mg/litro*
Emoglobina	2 g/litro <sup>1</sup>	-
BSA e gamma-globina	Fino a 120 g/litro*	1 g/litro <sup>†</sup>
Trigliceridi	5 g/litro*	-
Glucosio	10 g/litro*	10 g/litro*
Sangue	-	1% <sup>†</sup>
pH	-	pH 4 e pH 9 <sup>†</sup>

\* CLSI EP7-A2 Vol. 25 No. 27

<sup>†</sup> Bozza linee guida DFA (11.05.2011)

Nessuna delle sostanze indicate nella Tabella 3 sono interferenti, eccetto i campioni di plasma con alte concentrazioni di gamma-globulina (>30 g/litro) che possono portare a un ridotto recupero del DNA libero circolante.

Nota: il test è stato effettuato utilizzando applicazioni a valle esemplari per una valutazione della qualità degli acidi nucleici estratti. Tuttavia, diverse applicazioni a valle potrebbero avere requisiti diversi rispetto a purezza (ovvero assenza di sostanza potenzialmente interferenti), quindi anche l'identificazione e il test delle sostanze rilevanti devono essere determinati come parte dello sviluppo dell'applicazione a valle per ogni flusso di lavoro che coinvolga il QIASymphony DSP Circulating DNA Kit.

## Contaminazione crociata

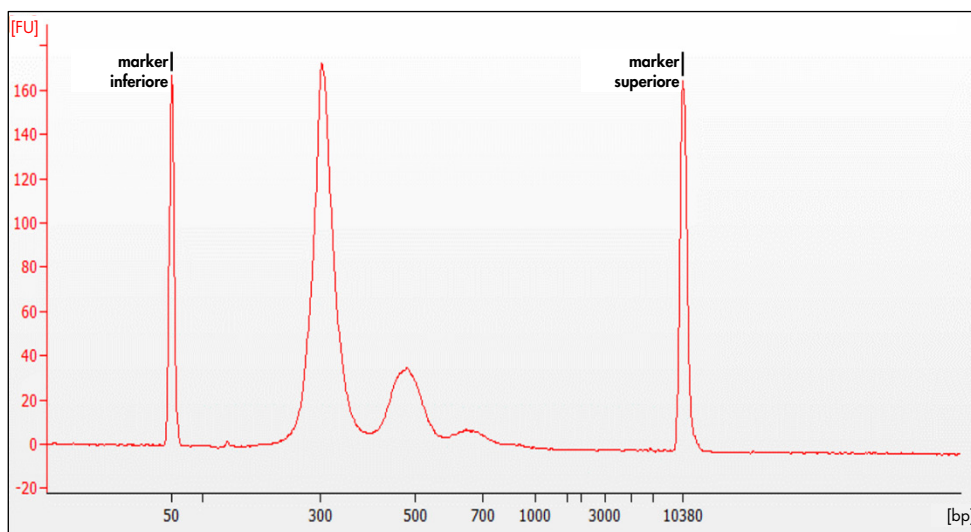
Il rischio di contaminazione crociata del sistema QIAasymphony DSP Circulating DNA è stato analizzato eseguendo tre processi con 96 campioni sullo strumento QIAasymphony SP con lotti a scacchiera alterna (alternanza di campioni positivi e negativi). Plasma femminile (campione negativo) e plasma femminile addizionato con gDNA maschile tranciato a una concentrazione di  $1,0E+05$  copie di gene SRY1 per millimetro di plasma (campione positivo) sono stati utilizzati come campioni per un sistema modello. La preparazione dei campioni è stata eseguita utilizzando il protocollo con 4 ml che include due trasferimenti di campioni separati, ognuno da 2 ml di volume. Una potenziale contaminazione dei campioni di plasma femminili negativi durante i processi di estrazione è stata valutata da analisi successive degli eluiti, utilizzando real-time PCR per il gene SRY1 specifico per il cromosoma Y.

Non sono state individuate contaminazioni crociate per carryover da campione a campione, lotto a lotto o processo a processo.

## Compatibilità per applicazioni a valle diverse

Applicazioni a valle esemplari sono state utilizzate durante lo sviluppo del QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit per dimostrare che gli acidi nucleici isolati sono compatibili con un'ampia gamma di diverse tecnologie per applicazioni a valle, compreso real-time PCR (vedere Figura 1, Figura 2, Figura 3, Figura 6 e Figura 7), Qubit Fluorometer (analisi di proteine e esame dsDNA High Sensitivity), Library (vedi Figura 8), e Next Generation Sequencing (NGS).


















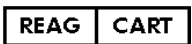
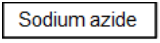
L'elettroferogramma nella Figura 8 mostra un esempio di ligazione con adattatori riuscita e conseguente amplificazione del ccfDNA. Accanto al picco più alto a 300 bp per il ccfDNA nucleosomale (circa 165 più circa 70 bp per ogni adattatore), è visibile anche il picco di-nucleosomale a circa 470 bp.



**Figura 8. Libreria DNA di ccfDNA (singolo donatore) estratta con il QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit.** Il ccfDNA è stato estratto dal plasma Streck utilizzando il protocollo con 4 ml e, in seguito, 35  $\mu$ l di eluito sono stati trasferiti nel NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit (BioLabs). Dopo l'amplificazione e la pulizia AMPure XP, 1  $\mu$ l di eluito è stato analizzato con il Agilent 7500 DNA Kit.

## Simboli

I seguenti simboli compaiono nelle istruzioni per l'uso o su confezioni ed etichette:

Simbolo	Definizione del simbolo
	Contenuto di reagenti sufficiente per <N> reazioni
	Data di scadenza
	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
	Numero di lotto
	Numero di materiale (vale a dire, l'etichetta del componente)
	Componenti
	Contenuto
	Numero
	Codice GTIN
Rn	"R" indica la revisione delle Istruzioni per l'uso (manuale) e "n" indica il numero della revisione
	Limite di temperatura
	Produttore
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Avvertenza/Cautela
	Proteinasi K
	Numero di pozzetto (ad es. pozzetto della cartuccia reagenti)
	Cartuccia reagenti
	Azide di sodio



Simbolo

Definizione del simbolo

**EtOH**

Etanolo

**UDI**

UDI (identificatore univoco del dispositivo)

## Cronologia delle revisioni

Revisione	Descrizione
R1, giugno 2022	Versione 2, Revisione 1 <ul style="list-style-type: none"><li>• Aggiornamento alla versione 2 per conformità a IVDR</li><li>• Aggiunte sezioni per Sostanze interferenti, Contaminazione crociata e Compatibilità con applicazioni a valle</li></ul>

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](http://www.qiagen.com) oppure possono essere richiesti ai servizi tecnici QIAGEN o al proprio distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight® (Gruppo QIAGEN); Cell-Free DNA Urine Preserve®, Cell-Free DNA BCT®, Streck® (Streck); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); Eppendorf®, LoBind® (Eppendorf AG); NEBNext® (New England Biolabs, Inc.); Qubit® (Thermo Fisher Scientific o società 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.

HB-3034-D01-001 © 2022 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

