

# Instrucțiuni de utilizare (caracteristici de performanță) pentru QIAsymphony<sup>®</sup> DSP DNA Kit

Versiunea 2



A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro

Pentru utilizare cu QIAsymphony DSP DNA Mini Kit și QIAsymphony DSP DNA Midi Kit



937236, 937255



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Germania

R1

Caracteristicile de performanță disponibile electronic pot fi găsite sub fila Resource (Resurse) a paginii produsului, la adresa [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Introducere generală

Produsele QIASymphony DSP DNA Kit sunt destinate utilizării exclusive în combinație cu QIASymphony SP.

Produsele QIASymphony DSP DNA Mini Kit oferă reactivi pentru purificarea automată a ADN-ului total din probele de sânge integral uman, de strat leuco-trombocitar, de țesuturi și de țesuturi fixate în formol și înglobate în parafină (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE), precum și a ADN-ului viral din sângele integral uman. Produsele QIASymphony DSP DNA Midi Kit oferă reactivi pentru purificarea automată a ADN-ului total din sânge integral uman și din stratul leuco-trombocitar. Cu toate acestea, nu au fost stabilite caracteristicile de performanță pentru fiecare tip de eprubetă de recoltare a sângelui sau țesut, acestea trebuind validate de către utilizator.

Tehnologia particulelor magnetice permite purificarea unor acizi nucleici de calitate ridicată, care nu conțin proteine, nucleaze și alte impurități. Acizii nucleici purificați sunt adecvați pentru utilizarea directă în aplicații din aval, precum reacțiile de amplificare (PCR). QIASymphony SP execută toate etapele procedurii de purificare. Într-un singur ciclu de funcționare se procesează până la 96 de probe, în loturi de până la 24 de probe.

În continuare sunt prezentate datele de performanță selectate pentru diferitele aplicații.

# Caracteristici de performanță

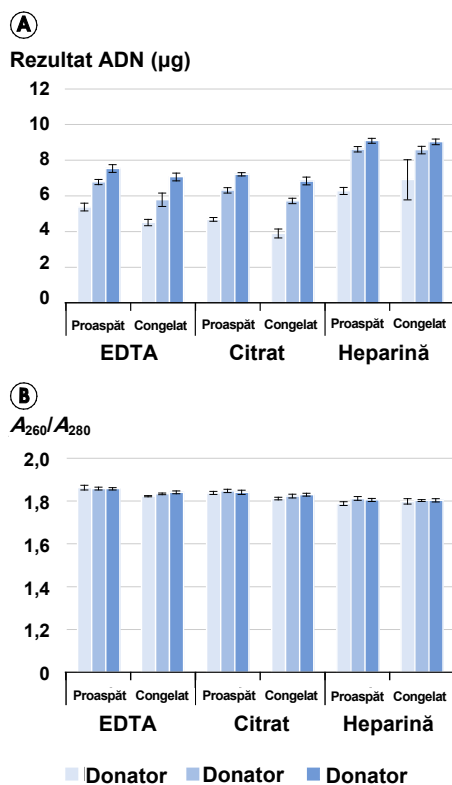
**Rețineți:** Caracteristicile de performanță depind foarte mult de factori variați și sunt legate de aplicația din aval specifică. Acestea au fost stabilite pentru QIASymphony DSP DNA Mini și Midi Kit împreună cu aplicații din aval tipice. Cu toate acestea, metodele de izolare a acizilor nucleici din specimenul biologic sunt utilizate ca interfață pentru mai multe aplicații din aval. Trebuie stabiliți parametrii de performanță, cum ar fi contaminarea încrucișată sau precizia testării pentru un astfel de flux de lucru, ca parte a dezvoltării aplicației din aval. Prin urmare, este responsabilitatea utilizatorului să valideze întregul flux de lucru pentru a stabili parametrii de performanță corespunzători.

## Performanța de bază și compatibilitatea cu diferite aplicații din aval

### ADN în sânge și strat leuco-trombocitar

#### Rezultat ADN

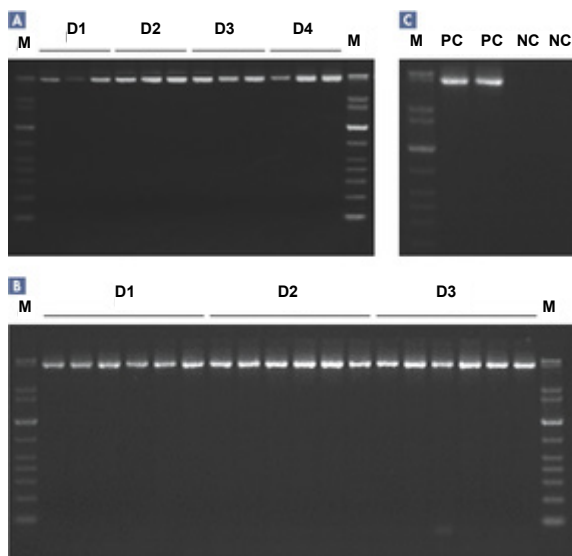
Performanța de bază a QIASymphony DSP DNA Mini Kit a fost evaluată utilizând diferite eprubete de recoltare și anticoagulanți, precum și sânge integral uman proaspăt și congelat. Sângele integral a fost recoltat de la 3 donatori sănătoși (număr de leucocite [white blood cell, WBC] 4,0 la 11,0 x 10<sup>6</sup> celule/ml) în 3 tipuri diferite de eprubete: EDTA, 10 ml BD™ Vacutainer® 16 x 100 mm (K2-EDTA); citrat, 2.7 ml Sarstedt® S-Monovette® 9NC Tube 13 x 75 mm (citrat); heparină, 7.5 ml Sarstedt S-Monovette 15 x 92 mm (litium-heparină). Sângele a fost folosit în stare proaspătă (depozitat la 2-8 °C) sau congelată (depozitat la -20 °C). ADN-ul genomic a fost purificat din probe de 200 μl, cu câte 4 duplicate pe donator și pe tip de eprubetă, utilizând QIASymphony DSP DNA Mini Kit și protocolul 200 DSP pentru sânge, cu un volum de eluție de 200 μl. Rezultatele și puritatea ADN-ului au fost determinate prin analiză spectroscopică (Figura 1).



**Figura 1. Rezultatul și puritatea ADN-ului, utilizând diferite eprubete de recoltare a probelor și diferiți anticoagulanți cu sânge integral uman proaspăt și congelat.**  
**A** Rezultat ADN, barele indică rezultatul absolut al ADN-ului cu abatere standard. **B** Puritate ADN, barele indică puritatea ADN-ului cu abatere standard.

## Integritate ADN

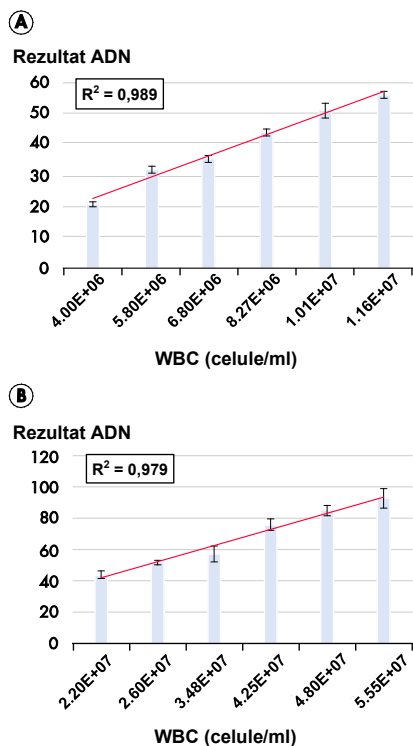
Prođuii PCR cu interval larg (5 kb) au fost amplificați utilizând un test LongRange PCR (Figura 2).



**Figura 2. Integritatea ADN-ului testată prin PCR cu interval larg.** M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder. **A** Sângele integral a fost recoltat de la 4 donatori sănătoși (D) în eprubete BD K2E. ADN-ul genomic pentru PCR cu interval larg a fost purificat din părți alicote de 200  $\mu$ l, în triplicat, utilizând QIASymphony DSP DNA Mini Kit și protocolul 200 DSP pentru sânge, cu un volum de eluție de 200  $\mu$ l. D1, donator 1; D2, donator 2; D3, donator 3 și D4, donator 4. **B** Sângele integral a fost recoltat de la 3 donatori sănătoși în eprubete BD K2E și a fost preparat stratul leuco-trombocitar. ADN-ul genomic a fost purificat din părți alicote de 200  $\mu$ l, în 6 duplicate, utilizând QIASymphony DSP DNA Mini Kit și protocolul 200 DSP pentru strat leuco-trombocitar, cu un volum de eluție de 200  $\mu$ l. D1, donator 1; D2, donator 2 și D3, donator 3. **C** Substanțe de control: PC, substanță de control pozitivă și NC, substanță de control negativă.

## Corelația dintre rezultatul ADN și numărul WBC

Performanța pentru aplicațiile QIASymphony DSP ADN în sânge și strat leuco-trombocitar a fost evaluată utilizând probe de sânge și de strat leuco-trombocitar, cu câte 6 numere diferite de leucocite (White Blood Cell, WBC) pentru fiecare tip de probă. În cazul sângelui integral, numerele de WBC au variat între  $4 \times 10^6$  celule/ml și  $11,6 \times 10^6$  celule/ml și, în cazul stratului leuco-trombocitar, numerele au variat între  $2,2 \times 10^7$  celule/ml și  $5,6 \times 10^7$  celule/ml. Rezultatele ADN-ului au fost determinate prin analiză spectroscopică și reprezentate grafic prin comparație cu numărul de WBC (Figura 3).



**Figura 3. Corelația dintre rezultatul ADN și numărul WBC.** **A** ADN-ul genomic a fost purificat din 1 ml de sânge integral uman, utilizând QIASymphony DSP DNA Midi Kit și protocolul 1000 DSP pentru sânge, cu un volum de eluție de 500  $\mu$ l. Barele indică rezultatul absolut al ADN-ului cu abatere standard. **B** ADN-ul genomic a fost purificat din 400  $\mu$ l de strat leuco-trombocitar, utilizând QIASymphony DSP DNA Midi Kit și protocolul 400 DSP pentru strat leuco-trombocitar, cu un volum de eluție de 400  $\mu$ l. Barele indică rezultatul absolut al ADN-ului cu abatere standard.

## Sânge viral

Au fost efectuate studii privind rata de succes, prin diluarea materialului standard CMV OMS cuantificat în prealabil, din sângele integral uman negativ la CMV. S-a observat o rată de detecție de 100 % pentru probele cu încărcare virală de 90 UI de CMV pe mililitru (Tabelul 1).

**Tabelul 1. Sensibilitatea aplicației QIASymphony DSP Virus Blood**

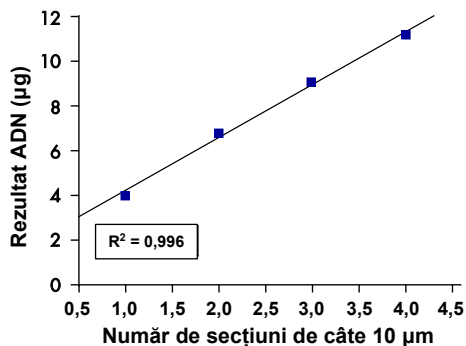
CMV (UI/ml)	Duplicate	Reușite	Reușite (%)
350	18	18	100,00
230	32	32	100,00
115	31	31	100,00
90	32	32	100,00
60	30	24	80,00
30	30	15	50,00
15	30	10	33,33
6	21	5	23,81
2	21	2	9,52
0	15	0	0,00

Sângele integral uman a fost recoltat de la 1 donator sănătos, negativ la CMV, în eprubete BD K2E, și îmbogățit cu material standard CMV OMS utilizând diferite titre. ADN-ul viral a fost purificat utilizând QIASymphony DSP DNA Mini Kit și protocolul 200 DSP pentru sânge viral, cu un volum de eluție de 60  $\mu$ l. Eluatele au fost analizate cu un test CMV real-time PCR.

## Țesuturi și țesuturi FFPE

### Rezultat ADN

Performanța pentru aplicația QIASymphony DSP DNA FFPE tissue a fost evaluată utilizând 6 duplicate de 1-4 secțiuni de FFPE de 10 μm din splină umană proaspăt tăiată. Extracția ADN-ului a fost efectuată utilizând QIASymphony DSP DNA Mini Kit împreună cu protocolul DSP cu conținut redus de țesut. Deparafinarea și liza au fost efectuate utilizând metoda de tratare prealabilă cu xilen/etanol. ADN-ul a fost eluat în 50 μl de soluție tampon pentru eluție, iar rezultatul ADN-ului a fost determinat prin analiză spectroscopică (Figura 4).



**Figura 4. Corelația dintre rezultatul ADN și numărul de secțiuni de FFPE.** Șase duplicate de 1-4 secțiuni de țesuturi FFPE de câte 10 μm din splină umană au fost deparafinate prin tratare prealabilă cu xilen/etanol. Extracția ADN-ului a fost efectuată pe QIASymphony SP utilizând QIASymphony DSP DNA Mini Kit împreună cu protocolul DSP cu conținut redus de țesut, și un volum de eluție de 50 μl.

### Analiza stadiului mutațional al markerilor biologici prin real-time PCR

Analiza stadiului mutațional al markerilor biologici a fost efectuată utilizând ADN extras din secțiuni de țesut FFPE din colon uman și ADN extras din probe de țesuturi din plămân uman.

Pentru extracția ADN-ului din probe de țesuturi FFPE, pentru prepararea probelor s-au utilizat 3 secțiuni de câte 10 μm de colon uman. Extracția ADN-ului a fost efectuată utilizând Deparafinization Solution pentru tratare prealabilă și protocolul DSP cu conținut redus de țesut, împreună cu volumul de eluție de 100 μl. Analiza mutațională a markerului biologic KRAS a fost efectuată utilizând un test real-time PCR pentru detecția KRAS în conformitate cu manualul testului. Valorile  $C_T$  ale testului de control s-au încadrat în intervalul definit, iar analiza de detecție a mutației a dezvăluit o substituție a aminoacidului în codonul 12, demonstrată de o valoare  $\Delta C_T$  egală cu 4,17, care se află sub valoarea de prag definită egală cu 8 pentru detecția unei mutații 12SER (Tabelul 2).

**Tabelul 2. Rezultatele analizei mutaționale pentru markerul biologic KRAS în țesuturile FFPE**

Probă	Reacție	C <sub>T</sub> țintă	Substanță de control internă C <sub>T</sub>	ΔC <sub>T</sub> *
Substanță de control fără șablon	Substanță de control	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	Substanță de control	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
Țesut FFPE (colon uman)	Substanță de control	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	–

\* ΔC<sub>T</sub> = M C<sub>T</sub> – C C<sub>T</sub>, unde M înseamnă mutație, iar C înseamnă substanță de control; n.d., nedetectat.

Pentru extracția ADN-ului din probe de țesuturi congelate, s-au folosit 25 mg de țesut pulmonar uman pentru prepararea probelor, utilizând protocolul DSP cu conținut ridicat de țesut și un volum de eluție de 200 μl. Analiza mutațională a markerului biologic EGFR a fost efectuată utilizând un test real-time PCR pentru EGFR. Analiza substanței de control și a detecției mutației a fost realizată conform descrierii din manualul testului. Rezultatele au dezvăluit o deleție la nivelul genei EGFR, lucru demonstrat de o valoare ΔC<sub>T</sub> de 2,47, care este mai mică decât valoarea-prag definită de 12 pentru detecția unei mutații (Tabelul 3).

**Tabelul 3. Rezultatele analizei mutaționale pentru markerul biologic EGFR în țesuturile congelate**

Probă	Reacție	C <sub>T</sub> țintă	Substanță de control internă C <sub>T</sub>	ΔC <sub>T</sub> *
Substanță de control fără șablon	Substanță de control	0,00	31,71	–
	T790M	0,00	32,36	–
	Deletions (Deleții)	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	Substanță de control	28,78	31,05	–
	T790M	30,08	31,13	1,30
	Deletions (Deleții)	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
Țesut (plămân uman)	Substanță de control	25,76	31,23	–
	T790M	n.d.	31,99	–
	Deletions (Deleții)	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	–

\* ΔC<sub>T</sub> = M C<sub>T</sub> – C C<sub>T</sub>, unde M înseamnă mutație, iar C înseamnă substanță de control; n.d., nedetectat.

## Repetabilitate și reproductibilitate

### ADN în sânge

Extracția ADN-ului a fost efectuată utilizând protocolul 200 DSP pentru sânge, cu un volum de eluție de 200  $\mu$ l. Repetabilitatea a fost evaluată de un singur operator, care a efectuat 3 testări independente (câte 96 de probe fiecare) în 3 zile diferite, fiecare testare fiind formată din câte 4 loturi a câte 24 de probe (Tabelul 4 și Tabelul 5).

Reproductibilitatea a fost evaluată prin efectuarea a 3 testări independente (câte 96 de probe fiecare) în 3 zile diferite, de 3 operatori diferiți, pe instrumente QIASymphony SP diferite, fiecare testare fiind formată din câte 4 loturi a câte 24 de probe (Tabelul 6 și Tabelul 7).

**Tabelul 4. Rezultatele evaluării repetabilității**

Testare	Lot	<i>n</i>	Rezultat ADN mediu ( $\mu$ g)	SD	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*, număr de duplicate; SD, abatere standard; CV, coeficient de variație.

**Tabelul 5. Date privind precizia pentru evaluarea repetabilității**

	SD	CV
Lot-lot în aceeași testare	0,25	4,95
Precizie globală la repetare	0,26	5,18

SD, abatere standard; CV, coeficient de variație.



**Tabelul 6. Rezultatele evaluării reproductibilității**

Testare	Lot	n	Rezultat ADN mediu (μg)	SD	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, număr de duplicate; SD, abatere standard; CV, coeficient de variație.

**Tabelul 7. Date privind precizia pentru evaluarea reproductibilității**

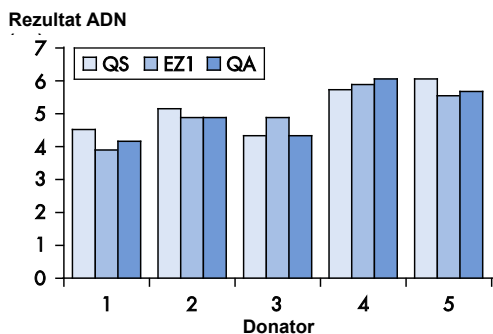
	SD	CV
Lot-lot în aceeași testare	0,25	4,73
Precizie globală la repetare	0,38	7,03

SD, abatere standard; CV, coeficient de variație.

## Performanță comparativă

### ADN în sânge

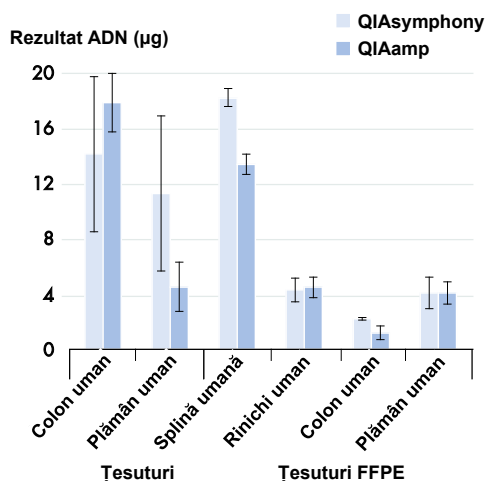
Performanța a fost analizată pentru sistemul QIASymphony DSP DNA Blood comparativ cu sistemul EZ1® DSP DNA Blood și procedura de preparare manuală QIAamp® DNA Blood Mini Kit. ADN-ul a fost purificat din probe de sânge diferite, apoi analizat pentru rezultatul ADN-ului (Figura 5).



**Figura 5. Compararea rezultatelor ADN-ului între diferite sisteme de purificare a ADN-ului din sânge.** Sângele integral a fost recoltat de la 5 donatori sănătoși în eprubete BD K2E. În cazul tuturor metodelor s-au utilizat volume de intrare ale probelor de 200 μl și volume de eluție de 200 μl. QS, QIASymphony DSP DNA Mini Kit și protocolul 200 DSP pentru sânge; EZ1, EZ1 Advanced XL utilizând EZ1 DSP DNA Blood Kit; QA, QIAamp DNA Blood Mini Kit. Barele indică rezultatul absolut al ADN-ului pentru fiecare probă.

## Țesuturi și țesuturi FFPE

Performanța QIASymphony DSP DNA Mini Kit a fost comparată cu performanța kitului manual QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit și QIAamp DSP DNA Mini Kit utilizând țesut FFPE și, respectiv, țesuturi proaspete și congelate, ca material de probă. Preparările manuale și automate ale probelor, precum și cuantificarea rezultatelor ADN-ului, au fost efectuate simultan. Rezultatele ADN-ului după extracția din probe proaspete/congelate și probe de țesuturi FFPE, utilizând QIASymphony DSP DNA Mini Kit, QIAamp DSP DNA Mini Kit (țesut) și QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (țesut FFPE) sunt prezentate în Figura 6.



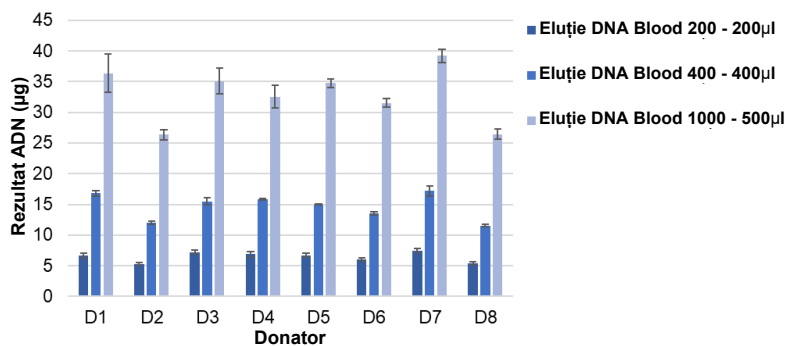
**Figura 6. Extracția ADN-ului din probe de țesut și de țesut FFPE.** Pentru țesuturile proaspete/congelate, s-au tăiat probe de plămân și de colon uman în 6 bucăți de câte 25 mg. Câte trei bucăți din fiecare tip de țesut au fost utilizate pentru prepararea probelor, utilizând QIASymphony SP împreună cu protocolul DSP cu conținut ridicat de țesut. Extracția ADN din probele rămase a fost efectuată utilizând QIAamp DSP DNA Mini Kit. ADN-ul a fost eluat în 200 μl, iar rezultatul ADN-ului a fost determinat prin analiză spectroscopică. Pentru extracția ADN-ului din țesuturile FFPE, au fost preparate 12 duplicate conținând 3 secțiuni de țesut FFPE de câte 10 μm din diferite organe umane. Șase probe au fost utilizate pentru prepararea probelor, utilizând QIASymphony SP împreună cu tratarea prealabilă cu Deparaffinization Solution și cu protocolul DSP cu conținut redus de țesut. Extracția ADN din probele rămase a fost efectuată utilizând QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. ADN-ul a fost eluat în 50 μl, iar rezultatul ADN-ului a fost determinat prin analiză spectroscopică. Barele indică rezultatul absolut al ADN-ului cu abatere standard.

## Intervalul de introducere a probelor/ieșire a eluațiilor

### ADN în sânge

Au fost comparate intervale diferite de intrare a probelor și de ieșire a eluațiilor pentru aplicația DNA Blood, utilizând probe de la donatori de sânge cu un interval al numărului de WBC între 5,0 și 8,0 x 10<sup>6</sup> celule/ml.

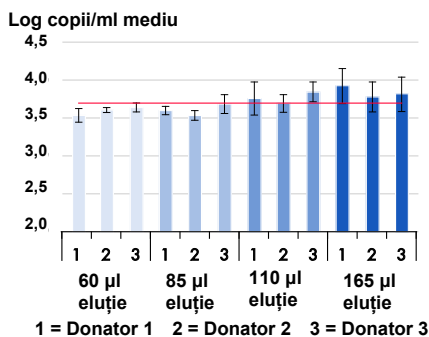
Sângele integral a fost recoltat de la 8 donatori sănătoși în eprubete BD K2E. ADN-ul a fost purificat din 6 duplicate, fiecare utilizând QIASymphony DSP DNA Mini/Midi Kit și protocolul DNA blood 200 DSP cu un volum de eluție de 200 μl, protocolul DNA blood 400 DSP cu un volum de eluție de 400 μl și protocolul DNA blood 1000 DSP cu un volum de eluție de 500 μl (Figura 7).



**Figura 7. Compararea diferitelor intrări de probe și volume de eluție pentru sistemele de purificare a ADN-ului din sânge.** Sângele integral a fost recoltat de la 8 donatori sănătoși în eprubete BD K2E. Extracția ADN-ului a fost realizată utilizând protocolul DNA blood 200 protocol cu volum de eluție de 200 µl, protocolul DNA blood 400 cu volum de eluție 400 µl și protocolul DNA blood 1000 cu volum de eluție 500 µl. Rezultatul ADN a fost determinat prin analiză spectroscopică. Barele prezintă rezultatul absolut al ADN-ului (valoare medie cu abatere standard) pentru fiecare donator.

## Sânge viral

Sângele integral a fost recoltat de la 3 donatori sănătoși, cu un interval al numărului de WBC cuprins între 4,0 și 11,0 x 10<sup>6</sup> celule/ml, în eprubete BD K2E și îmbogățit cu material standard CMV (titru 3,7 log copii/ml). ADN-ul viral a fost purificat din 7 duplicate, fiecare utilizând QIASymphony DSP DNA Mini Kit și protocolul 200 DSP pentru sânge viral, cu 4 volume de eluție diferite (Figura 8).



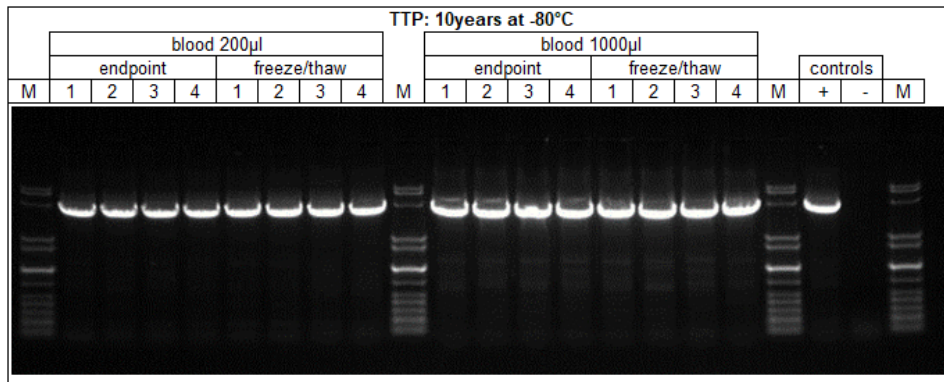
**Figura 8. Compararea cuantificării ADN-ului viral pentru volume de eluție diferite.** Eluatele din probele și volumele de eluție ale fiecărui donator (60, 85, 110 și 165 µl) au fost analizate cu un test CMV real-time PCR. Linia roșie reprezintă titrul țintă, iar barele indică valoarea medie log copii/mililitru cu abatere standard.

## Stabilitatea eluatului

**Rețineți:** Stabilitatea eluatului depinde foarte mult de factori variați și este legată de aplicația din aval specifică. Aceasta a fost stabilită pentru QIASymphony DSP Mini și Midi Kit împreună cu aplicații din aval tipice. Este responsabilitatea utilizatorului să consulte instrucțiunile de utilizare ale aplicației din aval specifice utilizate în laboratorul propriu și/sau să valideze întregul flux de lucru pentru a stabili condițiile de depozitare corespunzătoare.

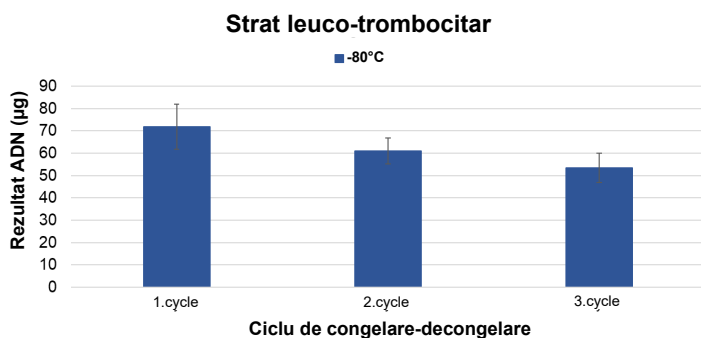
## ADN în sânge și strat leuco-trombocitar

Stabilitatea eluatului pentru aplicația DNA Blood a fost testată utilizând eluate din testări QS efectuate cu protocolul DNA Blood 200 cu volum de eluție 200 µl și cu protocolul DNA Blood 1000 cu volum de eluție 500 µl. Eluatele au fost depozitate în 2 ml Sarstedt Tubes la temperatura camerei, 2–8 °C, –20 °C și –80 °C. Rezultatul și puritatea ADN-ului au fost determinate prin analiză spectroscopică. Integritatea ADN-ului a fost analizată prin electroforeză în gel și un test LongRange PCR (Figura 9).



**Figura 9. Stabilitatea eluatului pentru DNA Blood.** ADN-ul a fost purificat utilizând protocoalele DNA Blood 200 µl și 1000 µl. Eluatele au fost depozitate la -80 °C în 2 ml Sarstedt Tubes. Au fost analizate patru duplicate. Integritatea ADN-ului a fost testată prin PCR cu interval larg. Cifrele indică rezultatele după depozitarea timp de 10 ani. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder.

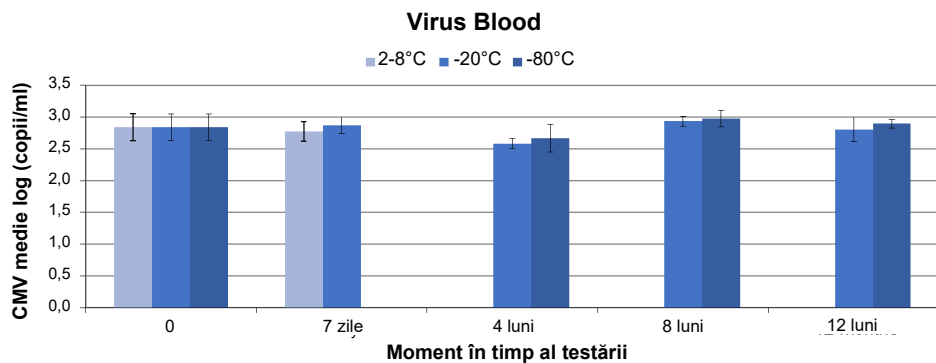
Stabilitatea eluatului pentru aplicația Buffy Coat a fost testată utilizând eluate din testări QS efectuate cu protocolul BC 400 µl și volumul de eluție de 200 µl. Eluatele au fost depozitate în 2 ml Sarstedt Tubes și Elution Micro Tube Racks la temperatura camerei, 2-8 °C, -20 °C și -80 °C. În plus, eluatele au fost supuse testării în stare congelată/decongelată pentru până la 3 cicluri (Figura 10). Rezultatul și puritatea ADN-ului au fost determinate prin analiză spectroscopică. Integritatea ADN-ului a fost analizată prin electroforeză în gel și un test LongRange PCR (reacție 50 µl).



**Figura 10. Cicluri de congelare-decongelare ale eluatelor pentru Buffy Coat.** ADN-ul a fost purificat utilizând protocolul DNA BC 400 µl. Stratul leuco-trombocitar a fost generat din sânge EDTA. Eluatele au fost depozitate în 2 ml Sarstedt Tubes. Rezultatul ADN-ului a fost determinat la momentele în timp ale testării, utilizând același eluat în 3 cicluri de congelare/decongelare. Rezultatul ADN a fost determinat prin analiză spectroscopică. Barele indică rezultatul absolut al ADN-ului (valoare medie cu abatere standard).

## Sânge viral

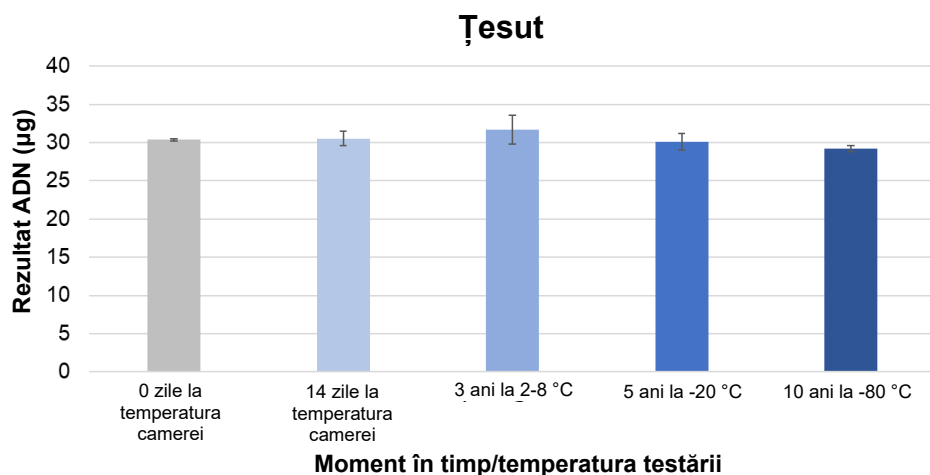
Stabilitatea eluatului pentru aplicația Virus Blood a fost testată utilizând eluate din testări QS efectuate cu protocolul Virus Blood 200 cu volum de eluție de 60 µl. Ca material de probă s-a utilizat sânge K<sub>2</sub> EDTA îmbogățit cu standard CMV din comerț (titru 2,7 log copii/ml). Eluatele au fost depozitate în 2 ml Sarstedt Tubes la 2-8 °C, -20 °C și -80 °C. Eluatele au fost analizate utilizând un test CMV în timp real (Figura 11). În continuare sunt prezentate rezultatele în mai multe momente în timp ale testării.



**Figura 11. Stabilitatea eluatului pentru ADN în sânge.** Probele de sânge EDTA îmbogățite cu standard CMV din comerț au fost purificate cu protocolul Virus Blood 200. Eluatele au fost depozitate la mai multe temperaturi în Elution Micro Tube racks și 2 ml Sarstedt Tubes. Au fost analizate câte 4 duplicate pentru fiecare moment în timp al testării. Barele indică titrul CMV (valoare medie log cu abatere standard).

## Țesut

Stabilitatea eluatului pentru aplicația Tissue a fost testată utilizând protocolul Tissue HC 200  $\mu$ l și volum de eluție de 200  $\mu$ l. Ca material de probă s-a utilizat ficat bovin proaspăt. Eluatele au fost depozitate în 2 ml Sarstedt Tubes și Elution Micro Tube Racks la temperatura camerei, 2-8  $^{\circ}$ C, -20  $^{\circ}$ C și -80  $^{\circ}$ C. Rezultatul și puritatea ADN-ului au fost determinate prin analiză spectroscopică (Figura 12). Integritatea ADN-ului a fost analizată prin electroforeză în gel.

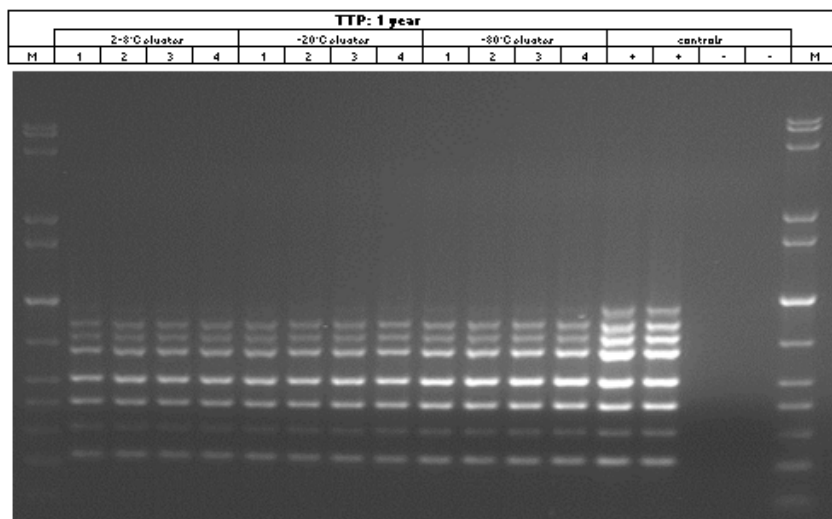


**Figura 12. Stabilitatea eluatului pentru Tissue.** ADN-ul a fost purificat utilizând protocolul DNA Tissue HC cu volum de eluție de 200  $\mu$ l. Ca material de probă s-a utilizat ficat bovin proaspăt. Eluatele au fost depozitate la mai multe temperaturi în Elution Micro Tube racks și 2 ml Sarstedt Tubes. Au fost analizate câte 4 duplicate pentru fiecare moment în timp al testării. Rezultatul ADN a fost determinat prin analiză spectroscopică. Barele indică rezultatul absolut al ADN-ului (valoare medie cu abatere standard).

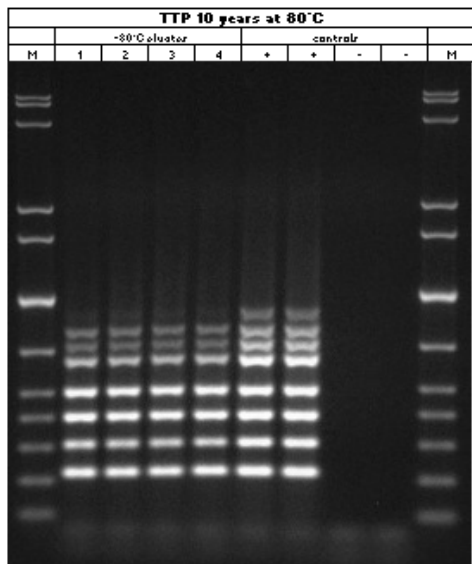
## Țesut FFPE

Stabilitatea eluatului pentru aplicația FFPE Tissue a fost testată utilizând protocolul Tissue LC 200  $\mu$ l și volum de eluție de 100  $\mu$ l. Ca material de probă s-a utilizat țesut FFPE uman din comerț. Eluatele au fost depozitate în 2 ml Sarstedt Tubes și Elution Micro Tube Racks la temperatura camerei, 2-8 °C, -20 °C și -80 °C. Eluatele au fost analizate cu un test Inhouse human 8-plex PCR (Figura 13). În continuare sunt prezentate rezultatele în două momente în timp ale testării.

A:



B:



**Figura 13. Stabilitatea eluatului pentru FFPE Tissue.** ADN-ul a fost purificat utilizând protocolul DNA Tissue LC. Ca material de probă s-a utilizat țesut FFPE din comerț. Eluatele au fost depozitate la mai multe temperaturi în Elution Micro Tube racks și 2 ml Sarstedt Tubes. Au fost analizate câte 4 duplicate pentru fiecare moment în timp al testării. Eluatele au fost analizate prin testul Inhouse human 8-plex PCR.

## Substanțe de interferență

Influența substanțelor inhibitoare care pot fi prezente în sângele integral asupra performanței aplicației ADN în sânge, a aplicației sânge viral și a aplicației țesut a fost testată prin adăugarea următoarelor substanțe:

**Tabelul 8. Substanțe de interferență potențiale, testate pentru diferitele aplicații**

Substanțe de interferență	Concentrație	Sânge	Sânge viral	Țesut
Bilirubină	200 mg/L	√	√	√
Hemoglobină	200 g/L	√	√	
Trigliceride	30 g/L	√	√	√
Proteină	120 g/L	√	√	√

**Rețineți:** „√” indică materialele de probă testate pentru substanța de interferență potențială respectivă.)

Pentru hemoglobină (200 g/l) și proteină (120 g/l), au fost determinate nivelurile existente în proba de sânge și s-a adăugat hemoglobină sau proteină suplimentară, pentru obținerea concentrațiilor indicate, 200 sau, respectiv, 120 g/l. Pentru bilirubină (200 mg/l) și trigliceride (30 g/l), cantitatea totală din fiecare substanță a fost adăugată în probe, pentru obținerea concentrațiilor indicate.

Pentru țesut, cantitatea totală din fiecare substanță s-a adăugat direct în lizați, fără a se realiza nicio determinare pentru concentrația de bilirubină, trigliceride sau proteine pentru proba tisulară utilizată.

Orice substanțe de interferență potențiale (de exemplu, medicamente) și concentrația corespunzătoare sunt extrem de specifice aplicației din aval și posibilelor tratamente medicale anterioare ale unui pacient și trebuie să fie investigate în timpul verificării unei astfel de aplicații din aval cu ajutorul produselor QIASymphony DSP DNA Mini și Midi Kit.

**Rețineți:** Testarea a fost efectuată utilizând aplicații din aval tipice pentru o evaluare a calității acizilor nucleici extrași. Cu toate acestea, diferite aplicații din aval pot avea cerințe diferite în ceea ce privește puritatea (adică absența sau concentrația de substanțe de interferență potențiale), astfel încât identificarea și testarea substanțelor relevante și a concentrațiilor respective trebuie, de asemenea, să fie stabilite ca parte a dezvoltării aplicației din aval pentru orice flux de lucru care implică produsele QIASymphony DSP Mini și Midi Kit.

**Rețineți:** Rețineți că, în timpul dezvoltării QIASymphony DSP DNA Midi Kit, nu s-au făcut observații cu privire la un posibil impact negativ al heparinei asupra performanței. Cu toate acestea, ISO 20186-2:2019(E) stipulează că heparina din tuburile de recoltare a sângelui poate avea un impact asupra purității acizilor nucleici izolați, iar posibilul transfer în eluați ar putea cauza inhibiții în unele aplicații din aval. Prin urmare, utilizatorul este responsabil pentru validare, în cazul în care heparina are o influență negativă asupra fluxului de lucru al acestuia.

## ADN în sânge și strat leuco-trombocitar

Pentru aplicațiile ADN în sânge, testarea a fost efectuată utilizând protocolul DSP DNA 1000, care acoperă cel mai mare volum de intrare a probei, utilizând volume de eluție de 200 și 500 μl.

Eluatele au fost analizate prin analiză spectroscopică pentru rezultatul și puritatea ADN-ului. Compatibilitatea PCR a fost testată prin utilizarea unui test real-time PCR, precum și a unui test PCR cu punct final.

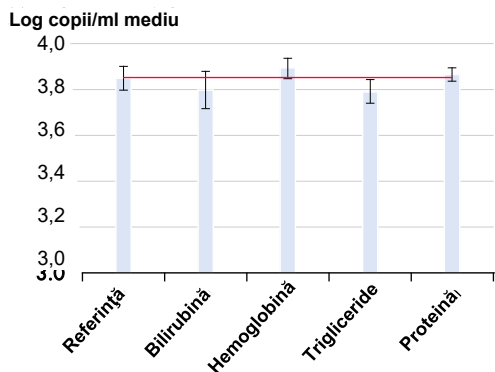
Niciuna dintre substanțele enumerate în Tabelul 9 nu interferează; totuși, probele de sânge cu concentrații ridicate de trigliceride (>30 g/l) pot genera un rezultat redus al ADN-ului genomic.

## Sânge viral

Pentru aplicația Virus Blood, testarea a fost efectuată utilizând protocolul DSP Virus Blood 200 cu volum de eluție de 60 µl. Probele de sânge negative la CMV au fost îmbogățite cu 500 copii/ml (concentrație scăzută) și cu  $1 \times 10^4$  copii/ml (concentrație ridicată, Figura 14) dintr-un standard CMV din comerț.

Eluatele au fost analizate cu un test CMV Real-time PCR.

Niciuna dintre substanțele enumerate în Tabelul 9 nu interferează; totuși, probele de sânge cu concentrații ridicate de trigliceride (>30 g/l) pot genera o purificare redusă a ADN-ului viral.



**Figura 14. Testarea substanțelor inhibitoare.** Sângele integral a fost recoltat de la 1 donator sănătos în eprubete BD K2E și îmbogățit cu material standard CMV (titru 4,0 log copii/ml). Au fost testate cinci probe, prin adăugarea inhibitorilor potențiali, iar ADN-ul viral a fost purificat din câte 4 duplicate ale fiecărei probe, utilizând QIASymphony DSP DNA Mini Kit și protocolul 200 DSP pentru sânge viral, cu un volum de eluție de 165 µl. Eluatele au fost analizate cu un test CMV real-time PCR. Linia roșie reprezintă titrul determinat pentru probele de referință care nu au fost îmbogățite cu nicio substanță inhibitoare, iar barele indică valoarea medie log copii/mililitru cu abatere standard.

## Țesut

Pentru DNA Tissue (proaspăt și congelat), testarea a fost efectuată utilizând protocolul DSP DNA HC cu volum de eluție de 200 µl.

Eluatele au fost analizate prin analiză spectroscopică pentru rezultatul și puritatea ADN-ului. Compatibilitatea PCR a fost testată prin utilizarea unui test real-time PCR.

Niciuna dintre substanțele enumerate în Tabelul 9 nu a fost identificată ca având un impact negativ asupra preparării probelor.

## Țesut FFPE

Pentru FFPE Tissue, testarea a fost efectuată utilizând protocolul DSP DNA LC cu volum de eluție de 50 µl.

Substanțele (consultați Tabelul 9) au fost adăugate direct în lizat.



**Tabelul 9. Substanțe de interferență potențiale, testate pentru diferitele aplicații**

Substanțe de interferență	Concentrație în lizat
Xilen	Până la 11 %
Etanol	Până la 11 %
Deparaffinization Solution	Până la 11 %
Parafină	Secțiune 0,1 μM

Eluatele au fost analizate prin analiză spectroscopică pentru rezultatul și puritatea ADN-ului. Compatibilitatea PCR a fost testată prin utilizarea unui test real-time PCR, precum și a unui test Inhouse human 8-plex PCR.

Niciuna dintre substanțele enumerate în Tabelul 9 nu a fost identificată ca având un impact negativ asupra preparării probelor.

## Contaminare încrucișată





### ADN în sânge

Riscul de contaminare încrucișată a aplicației QIASymphony DNA Blood a fost analizat prin efectuarea a patru testări de câte 96 de probe pe instrumentul QIASymphony SP cu loturi într-un tipar tablă de șah alternative (probe pozitive alternând cu probe negative), întrerupte de loturi complet negative. Sângele prelevat de la bărbați (conținând un număr de WBC  $\geq 1,0 \times 10^7$  celule/ml) și sângele prelevat de la femei, conținând un număr de WBC cuprins între  $4,0 \times 10^6$  și  $9 \times 10^6$  celule/ml a fost utilizat ca sistem model. Prepararea probelor a fost efectuată utilizând protocolul Blood 1000 μl, care acoperă cel mai mare volum al probei. O potențială contaminare a probelor negative prelevate de la femei în timpul execuțiilor de extracție a fost evaluată prin analiza ulterioară a eluatelor cu ajutorul unui test real-time PCR pentru cromozomul Y.

Nu a fost detectată nicio contaminare încrucișată în cazul transferului de la o probă la alta, de la un lot la altul sau de la o testare la alta.

## Simboluri

În acest document apar următoarele simboluri. Pentru o listă completă a simbolurilor utilizate în instrucțiunile de utilizare sau pe ambalaj și etichetă, consultați manualul.

Simbol	Definiția simbolului
	Acest produs îndeplinește cerințele Regulamentului european 2017/746 pentru dispozitive medicale pentru diagnostic in vitro.
	Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro
	Număr catalog
Rn	R reprezintă revizuirea Instrucțiunilor de utilizare, iar n este numărul revizuirii
	Producător

## Istoricul reviziilor

Ediție	Descriere
R1, iunie 2022	Versiunea 2, ediția 1 <ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="619 395 1251 421">• Actualizare la versiunea 2 pentru conformitate cu IVDR</li><li data-bbox="619 438 1417 493">• S-au adăugat secțiuni pentru substanțe de interferență, contaminare încrucișată, stabilitatea eluatului și compatibilitatea cu aplicații din aval</li></ul>

Pentru informații actualizate privind licențele și clauzele de declinare a răspunderii specifice produselor, consultați ghidul sau manualul de utilizare al kitului QIAGEN respectiv. Ghidurile și manualele de utilizare pentru kiturile QIAGEN sunt disponibile pe [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) sau pot fi solicitate de la Serviciile tehnice QIAGEN sau distribuitorul dumneavoastră local.

Mărci comerciale: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAsymphony®, QIAamp®, EZ1®, UltraRun® (QIAGEN Group); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.). Denumirile înregistrate, mărcile comerciale etc. utilizate în documentul de față, chiar dacă nu sunt marcate în mod specific, sunt protejate prin lege.

06/2022 HB-3029-D01-001 © 2022 QIAGEN, toate drepturile rezervate.

