

# QIAamp<sup>®</sup> DSP Circulating NA Kit

## — Instrukcja użycia (Parametry skuteczności)

Wersja 2



Do diagnostyki in vitro

Do użytku z zestawem QIAamp DSP Circulating NA Kit



REF

61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Niemcy

R1

Dokument Parametry skuteczności jest dostępny w formie elektronicznej i można go znaleźć na karcie materiałów źródłowych na stronie produktu pod adresem [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Wprowadzenie ogólne

Zestaw QIAamp DSP Circulating NA Kit to system, który wykorzystuje technologię membrany krzemionkowej (technologia QIAamp) do ręcznej izolacji i oczyszczania wolnokrążącego (circulating, cell-free, ccf) DNA i RNA z próbek osocza krwi ludzkiej.

Produkt jest przeznaczony do stosowania przez profesjonalnych użytkowników, takich jak technicy i lekarze przeszkoleni w zakresie technik biologii molekularnej.

Zestaw QIAamp DSP Circulating NA Kit jest przeznaczony do diagnostyki in vitro.

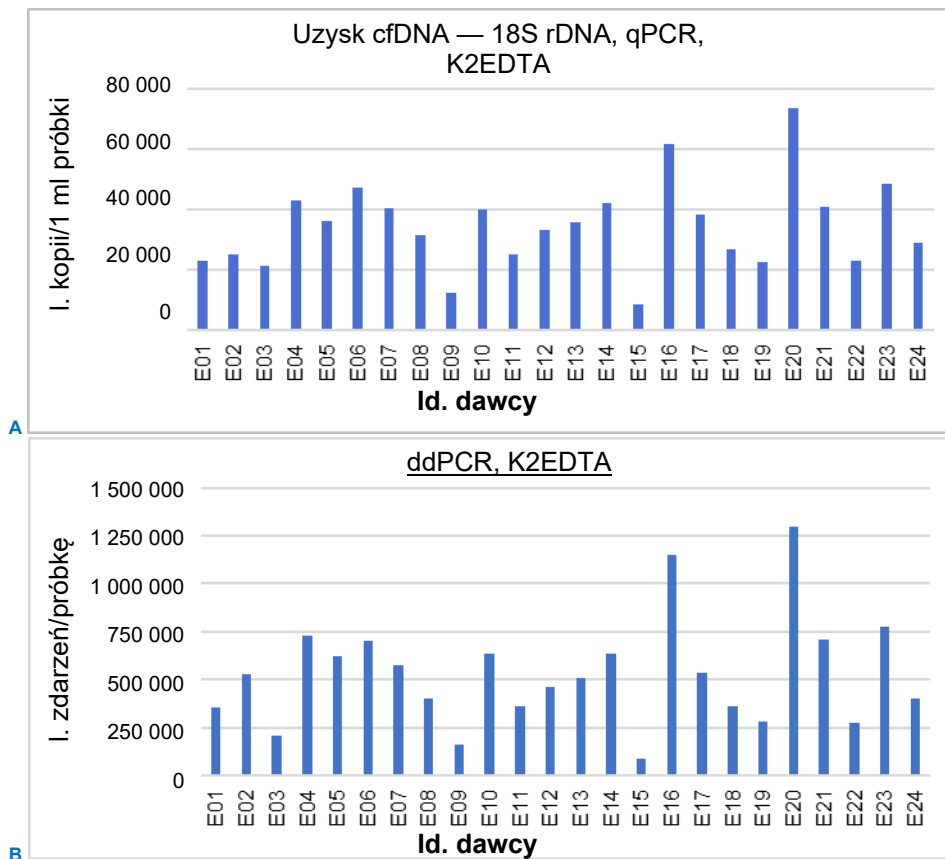
## Uzysk oczyszczonych kwasów nukleinowych (Nucleic Acid, NA)

W przypadku próbek osocza uzysk oczyszczonych kwasów nukleinowych może być bardzo różny. Z tego względu użytkownicy powinni przeprowadzić optymalizację wejściowej objętości osocza oraz objętości elucji dla własnego laboratorium, biorąc pod uwagę określoną procedurę docelową oraz procedurę wykonywaną na dalszym etapie.

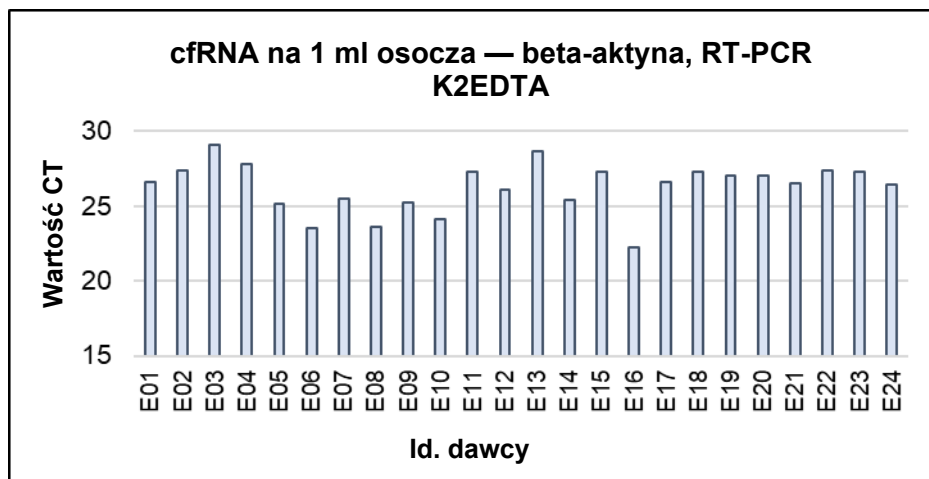
Jeśli zestaw ten jest używany w połączeniu z wykonywaną na dalszym etapie procedurą opracowaną przez firmę QIAGEN®, należy zapoznać się z odpowiednią instrukcją obsługi, aby uzyskać wskazówki.

## Analiza procedur wykonywanych na dalszym etapie

Kwasy nukleinowe wyizolowane za pomocą zestawu QIAamp DSP Circulating NA Kit są gotowe do użytku w różnych procedurach wykonywanych na dalszym etapie. W celu oceny skuteczności przeprowadzono serię izolacji kwasów nukleinowych z próbek ludzkiego osocza krwi pobranych od jednego dawcy, używając trzech różnych probówek do pobierania krwi (BD Vacutainer® K2EDTA Tube, Becton Dickinson and Company; PAXgene® Blood ccfDNA Tube, PreAnalytiX GmbH; i Streck® Cell-Free DNA Blood Collection Tube (BCT)®, Streck; w przypadku każdej z probówek  $n=24$  dawców). Przebadano eluaty otrzymane z osocza o wejściowej objętości równej 1 ml, wykonując ilościową reakcję PCR (quantitative PCR, qPCR, Ryc. 1A), emulsyjną reakcję PCR (digital droplet PCR, ddPCR, Ryc. 1B) oraz reakcję qPCR z odwrotną transkrypcją (Reverse Transcription qPCR, RT-qPCR) pod kątem obecności RNA (wyłącznie osocze przechowywane w probówce BD Vacutainer K2EDTA Tube, Ryc. 2).



Ryc. 1. Porównanie wyników otrzymanych dla osocza pobranego od jednego dawcy (objętość wejściowa: 1 ml) między testami qPCR i ddPCR (Bio-Rad®)



Ryc. 2. Wykrywanie pozakomórkowego RNA w osoczu pobranym od jednego dawcy (objętość wejściowa: 1 ml) za pomocą oznaczenia wykonywanego metodą RT-qPCR, dla którego cząsteczką docelową jest ludzki gen beta-aktyny (fragment o długości 293 pz).

W celu wykonania analizy metodą sekwencjonowania nowej generacji (Next Generation Sequencing, NGS) uzyskano eluaty z osocza o objętości wejściowej 5 ml (próbówka BD Vacutainer K2EDTA Tube, próbówka PAXgene Blood ccfDNA Tube i próbówka Streck Cell-Free DNA BCT; w przypadku każdej z próbek  $n=8$  dawców). Całkowity uzysk DNA dla próbek osocza o objętości 5 ml określony za pomocą oznaczenia Qubit® HS dsDNA mieścił się w zakresie między 50 a 150 ng DNA. Analizę NGS przeprowadzono za pomocą panelu GeneRead® QIAact Actionable Insights Tumor Panel i systemu GeneReader®. Wszystkie próbki zostały pomyślnie wzbogacone, a biblioteki zostały wygenerowane. Ponad 98% wygenerowanych odczytów zostało zmapowanych do ludzkiego genomu, a >99,8% spośród pozycji w regionach zainteresowania miało pokrycie zasad  $\geq 500x$ .

Dla obu rodzajów kwasów nukleinowych (DNA i RNA) wykazano pomyślny przebieg procedur wykonywanych na dalszym etapie (Ryc. 3).

	qPCR	ddPCR	RT-qPCR	NGS
K2EDTA	✓	✓	✓	✓
PAXgene	✓	✓	nie badano	✓
Streck	✓	✓	nie badano	✓

Ryc. 3. Pomyślne użycie wyizolowanych kwasów nukleinowych w różnych procedurach wykonywanych na dalszym etapie.

Użytkownik powinien zoptymalizować wejściową objętość osocza i objętość elucji, biorąc pod uwagę cząsteczkę docelową oraz wszelkie procedury wykonywane w laboratorium na dalszym etapie lub odnosząc się do parametrów skuteczności swoistych dla określonej dalszej procedury.

## Stabilność eluatu

Stabilność eluatu będzie zależeć od zawartości oraz typu wyizolowanych kwasów nukleinowych, objętości elucji oraz warunków przechowywania. Zalecamy określenie stabilności eluatów odpowiednio do szczególnych wymogów użytkownika.

Stabilność eluatu przetestowano dla DNA oraz eluatów otrzymanych z próbek ludzkiego osocza pobranych do probówek BD Vacutainer K2EDTA Tube (Becton Dickinson and Company) oraz stabilizujących probówek do pobierania krwi (PAXgene Blood ccfDNA Tube i Streck Cell-Free DNA BCT). Eluaty przechowywano w temperaturach od  $-30^{\circ}\text{C}$  do  $-15^{\circ}\text{C}$  oraz od  $-90^{\circ}\text{C}$  do  $-65^{\circ}\text{C}$ . Nie zaobserwowano degradacji materiału przez okres przechowywania trwający do 12 miesięcy. Eluaty przechowywane w temperaturze  $2-8^{\circ}\text{C}$  oraz w temperaturze pokojowej ( $15-25^{\circ}\text{C}$ ) zachowywały stabilność przez maksymalnie 48 godzin. Wszystkie warunki oceniono za pomocą testu qPCR, dla którego cząsteczką docelową był ludzki gen 18S rDNA.

Stabilność eluatu przetestowano dla RNA oraz eluatów otrzymanych z próbek ludzkiego osocza pobranych do probówek BD Vacutainer K2EDTA Tube (Becton Dickinson and Company). Eluaty przechowywano w temperaturach od  $-30^{\circ}\text{C}$  do  $-15^{\circ}\text{C}$  oraz od  $-90^{\circ}\text{C}$  do  $-65^{\circ}\text{C}$ . Nie zaobserwowano degradacji materiału przez okres przechowywania trwający do 6 miesięcy. Eluaty przechowywane w temperaturze  $2-8^{\circ}\text{C}$  zachowywały stabilność przez maksymalnie 48 godzin. Wszystkie warunki oceniono za pomocą testu RT-qPCR, dla którego cząsteczką docelową był ludzki gen beta aktywny.

Jeśli zestaw ten jest używany w połączeniu z wykonywanymi na dalszym etapie procedurami opracowanymi przez firmę QIAGEN, należy zapoznać się z instrukcją obsługi odpowiedniego zestawu, aby uzyskać wskazówki.

## Precyzja izolacji kwasów nukleinowych

Precyzję oceniono przy użyciu ludzkiego osocza, a warunki oceniono za pomocą testu qPCR, dla którego cząsteczką docelową był ludzki gen 18S rDNA.

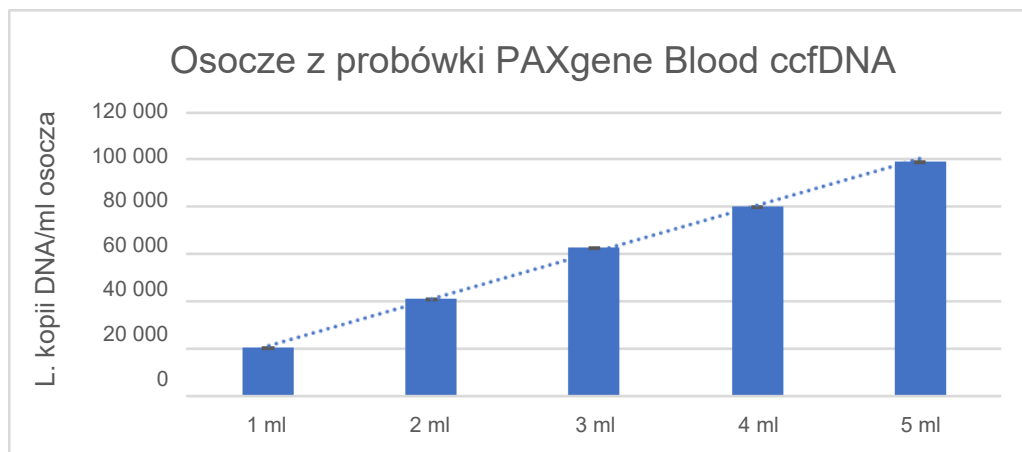
W projekcie eksperymentu uwzględniono 12 serii oczyszczania po 12 powtórzeń (łącznie 144 oczyszczone próbki). Serie oczyszczania były przeprowadzane przez trzech różnych operatorów, w trzech różnych dniach, przy użyciu trzech różnych aparatów oraz trzech różnych serii zestawu QIAamp DSP Circulating NA Kit. Dla każdego pojedynczego parametru oraz dla zmienności ogólnej (łącznej) zestawu QIAamp DSP Circulating NA Kit określono odchylenie standardowe (Standard Deviation, SD) i współczynnik zmienności (Coefficient of Variation, CV) (Tabela 1).

Tabela 1. Wyniki badania precyzji

Precyzja			
Parametr	Średnia liczba kopii/ml	SD	CV (%)
Między seriami testu		461	1,78
Między operatorami		1392	5,38
Między aparatami	25 894	228	0,88
Między dniami		2096	8,09
Między seriami zestawu		969	3,74
Łącznie		3120	12,05

## Liniowość

Otrzymano dane dla objętości wejściowej 1–5 ml osocza z krwi przechowywanej w probówkach BD Vacutainer K2EDTA Tube, PAXgene Blood ccfDNA Tube oraz Streck Cell-Free DNA BCT. Dla wszystkich probówek BCT zaobserwowano liniowy wzrost uzysku DNA (patrz Ryc. 4); w przypadku probówek BD Vacutainer K2EDTA Tube zaobserwowano to również dla RNA.



**Ryc. 4. Liniowy wzrost całkowitego uzysku DNA (kopie DNA/ml wejściowej objętości osocza) w przypadku różnych objętości wejściowych osocza.** Przedstawiono dane dla osocza przechowywanego w probówkach PAXgene Blood ccfDNA Tube; równoważne wyniki otrzymano dla osocza przechowywanego w probówkach BD Vacutainer K2EDTA Tube (DNA/RNA) i Streck Cell-Free DNA BCT.

## Równoważność protokołów (protokół Breeze/klasyczny)

Określono równoważność skuteczności protokołu Breeze i protokołu klasycznego, wykazując, że odpowiedni 95-procentowy limit ufności obliczony dla różnicy w średniej wartości Ct (RNA) lub średniej liczbie kopii/ml (DNA) wynosił  $\pm 2 \times \text{STD}$ , przy czym STD to obserwowana precyzja protokołu klasycznego (warunki odniesienia). Używano trzech serii zestawu, a eksperymenty przeprowadzało trzech operatorów.

Precyzja całkowita (STD) wartości Ct otrzymana dla protokołu Breeze była niższa niż górny limit dwustronnego 95-procentowego przedziału predykcji dla precyzji całkowitej (STD) protokołu klasycznego, przy czym przedział predykcji był obliczony w obrębie badania przy użyciu danych z protokołu klasycznego ( $n=143$ ) oraz przy użyciu liczby punktów danych dla protokołu Breeze ( $n=144$ ) w badaniu.

## Substancje zakłócające

Substancje potencjalnie zakłócające mogą pochodzić z różnych źródeł, np. mogą to być naturalne metabolity, substancje wprowadzone do ciała pacjenta podczas leczenia lub substancje spożyte przez pacjenta. Dla zestawu QIAamp DSP Circulating NA Kit przetestowano następujące endogenne substancje: hemoglobina, trójglicerydy, EDTA, kofeina, albumina, związana bilirubina i niezwiązana bilirubina. Nie zaobserwowano żadnych zakłóceń testu qPCR, który podczas tego badania reprezentował procedurę wykonywaną na dalszym etapie. Ponadto podczas przetwarzania próbek i izolacji kwasów nukleinowych nie zaobserwowano żadnych zakłóceń spowodowanych przez składniki zestawu QIAamp DSP Circulating NA Kit (odczynniki Proteinase K, Buffer ACL, Buffer ACB, Buffer ACW1, Buffer ACW2 i etanol).

Ze względu na złożoność substancji potencjalnie zakłócających i różną czułość konkretnych procedur wykonywanych na dalszym etapie, zalecamy użytkownikom ocenę wpływu substancji zakłócających swoistych dla danego przepływu pracy i zwalidowanie metody kontrolowania zakłóceń w konkretnej procedurze diagnostycznej wykonywanej na dalszym etapie.





Dalsze informacje na temat substancji zakłócających działanie konkretnych procedur firmy QIAGEN wykonywanych na dalszym etapie przedstawiono w odpowiednich instrukcjach obsługi zestawów.

## Zanieczyszczenie krzyżowe

W celu oceny poziomu zanieczyszczenia krzyżowego do próbek ludzkiego osocza krwi o objętości równej 5 lub 2 ml dodano wirusa HBV w ilości 105 kopii (próbki pozytywne) i przeprowadzono izolację równoległą z próbkami niezawierającymi wirusa (próbki negatywne) w konfiguracji szachownicy, naprzemiennie z seriami izolacji, w których znajdowały się tylko próbki negatywne (w celu oceny zanieczyszczenia krzyżowego między seriami izolacji oraz wewnątrz serii izolacji). Celem badania było odwzorowanie sytuacji, w której podczas procedury izolacji próbki zawierające wysokie stężenie docelowych cząsteczek kwasów nukleinowych mogą zanieczyścić krzyżowo inne próbki. Oczyszczanie kwasów nukleinowych (NA) przeprowadzono za pomocą jednej serii odczynników. Zanieczyszczenie krzyżowe oceniono za pomocą zestawu *artus*<sup>®</sup> HBV RG CE PCR Kit. Wyniki wykazały, że w całym systemie nie doszło do zanieczyszczenia krzyżowego.

## Symbole

---

	Ten produkt spełnia wymogi rozporządzenia europejskiego 2017/746 w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro.
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Numer katalogowy
	Producent
Rn	R oznacza wydanie dokumentu Instrukcja użycia (Parametry skuteczności), a n to numer wydania

---



# Historia zmian dokumentu

Wydanie	Opis
R1, czerwiec 2022 r.	<p>Aktualizacja dla wersji 2 zestawu QIAamp DSP Circulating Kit w celu zapewnienia zgodności z rozporządzeniem IVDR</p> <p>Dodano informację o „ręcznej” izolacji w części dotyczącej przeznaczenia. Nie wprowadzono zmian danych dotyczących skuteczności w porównaniu do wersji 1 zestawu.</p>

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu firmy QIAGEN. Instrukcje obsługi i podręczniki użytkownika zestawów QIAGEN są dostępne pod adresem [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Można je także zamówić w serwisie technicznym lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, *artus*®, GeneRead®, GeneReader® (QIAGEN Group); 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 lub podmioty zależne). Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały wyraźnie oznaczone jako zastrzeżone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa.

06/2022 HB-3049-D01-001 © 2022 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

