

Οδηγίες χρήσης (Χαρακτηριστικά απόδοσης) του QIAamp[®] DSP Circulating NA Kit

Έκδοση 2



Για in vitro διαγνωστική χρήση
Για χρήση με το QIAamp DSP Circulating NA Kit



REF

61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Γερμανία

R1

Το έντυπο Χαρακτηριστικά απόδοσης διατίθεται ηλεκτρονικά στην καρτέλα πόρων της σελίδας προϊόντος στη διεύθυνση www.qiagen.com.

Γενική εισαγωγή

Το QIAamp DSP Circulating NA Kit είναι ένα σύστημα που χρησιμοποιεί τεχνολογία μεμβράνης πυριτίου (τεχνολογία QIAamp) για τη χειροκίνητη απομόνωση και τον καθαρισμό του ελεύθερου κυττάρων κυκλοφορούντος (ccf) DNA και RNA από δείγματα ανθρώπινου πλάσματος αίματος.

Το προϊόν προορίζεται για χρήση από επαγγελματίες, όπως τεχνολόγους και ιατρούς, που έχουν εκπαιδευτεί σε τεχνικές μοριακής βιολογίας.

Το QIAamp DSP Circulating NA Kit προορίζεται για in vitro διαγνωστική χρήση.

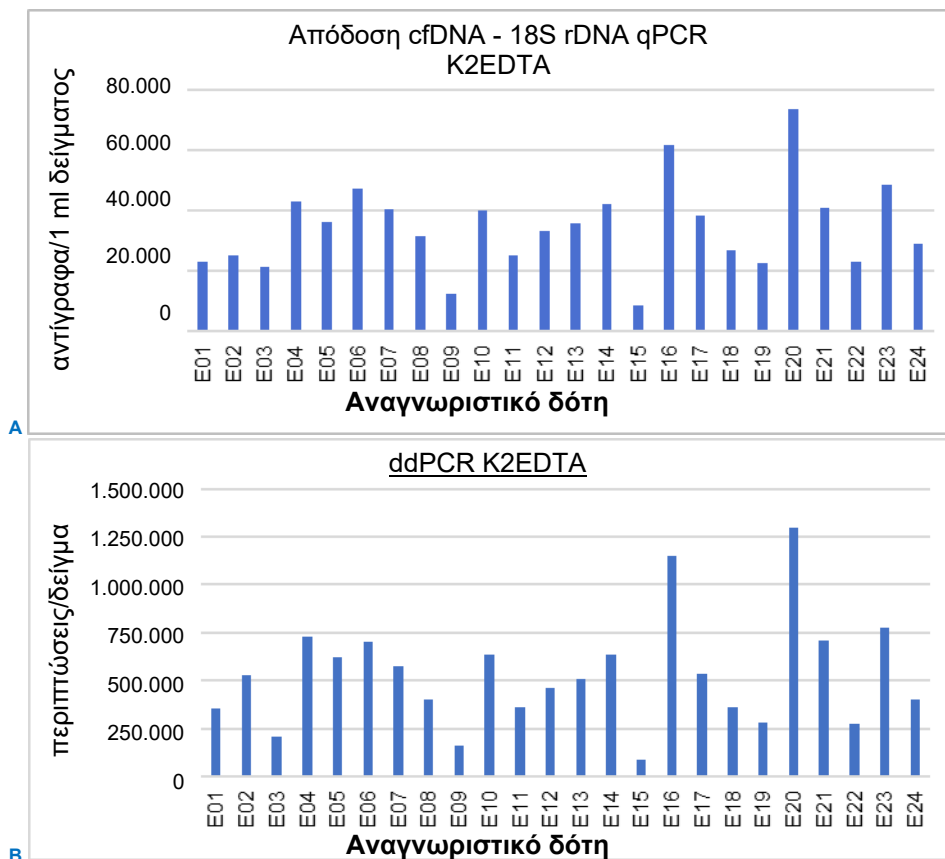
Απόδοση κεκαθαρμένων νουκλεϊκών οξέων (NO)

Τα δείγματα πλάσματος ενδέχεται να παρουσιάζουν υψηλή διακύμανση όσον αφορά την απόδοση κεκαθαρμένων νουκλεϊκών οξέων. Συνεπώς, οι χρήστες θα πρέπει να βελτιστοποιούν τον όγκο εισαγωγής πλάσματος και τον όγκο έκλουσης του ειδικού στόχου τους, καθώς και τις καθοδικές (downstream) εφαρμογές στο εργαστήριό τους.

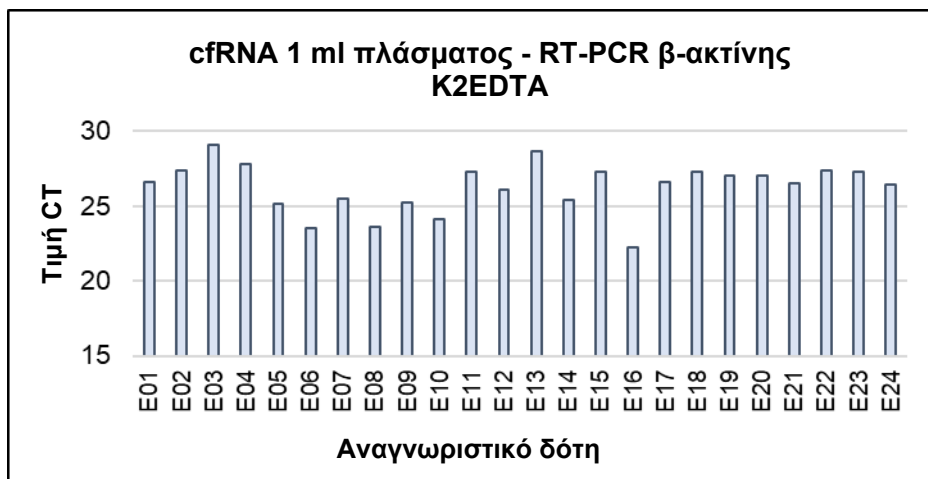
Εάν το kit χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με καθοδική (downstream) εφαρμογή QIAGEN®, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο για οδηγίες.

Ανάλυση καθοδικών (downstream) εφαρμογών

Τα νουκλεϊκά οξέα που απομονώνονται με το QIAamp DSP Circulating NA Kit είναι έτοιμα για χρήση σε διάφορες καθοδικές (downstream) εφαρμογές. Για την αξιολόγηση της απόδοσης, νουκλεϊκά οξέα από ανθρώπινο πλάσμα αίματος ενός μόνο δότη απομονώθηκαν με τη χρήση τριών διαφορετικών σωληναρίων συλλογής αίματος (BD Vacutainer® K2EDTA Tube, Becton Dickinson and Company, PAXgene® Blood ccfDNA Tube, PreAnalytiX GmbH, και Streck® Cell-Free DNA Blood Collection Tube (BCT)®, Streck, $n = 24$ δότες στο καθένα). Τα εκλούσματα από όγκο εισαγωγής πλάσματος 1 ml υποβλήθηκαν σε δοκιμασία με τη χρήση ποσοτικής PCR (qPCR, Εικόνα 1A), ψηφιακής PCR τεχνολογίας σταγονιδίων (ddPCR, Εικόνα 1B), καθώς και qPCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-qPCR) για RNA (μόνο πλάσμα του BD Vacutainer K2EDTA Tube, Εικόνα 2).



Εικόνα 1. Σύγκριση πλάσματος ενός μόνο δότη (όγκος εισαγωγής 1 ml) μεταξύ qPCR και ddPCR (Bio-Rad®)



Εικόνα 2. Ανίχνευση RNA ελεύθερου κυττάρων σε πλάσμα ενός μόνο δότη (όγκος εισαγωγής 1 ml) με τη χρήση προσδιορισμού RT-qPCR για το ανθρώπινο γονίδιο της β-ακτίνης (μήκος τμήματος 293 bp).

Για την ανάλυση αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS), δημιουργήθηκαν εκλούσματα από όγκο εισαγωγής πλάσματος 5 ml (BD Vacutainer K2EDTA Tube, PAXgene Blood cfDNA Tube και Streck Cell-Free DNA BCT, $n = 8$ δότες στο καθένα). Η απόδοση ολικού DNA για πλάσμα 5 ml κυμάνθηκε μεταξύ 50 και 150 ng DNA που ανιχνεύθηκαν με τον προσδιορισμό Qubit® HS dsDNA. Η ανάλυση NGS πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του GeneRead® QIAact Actionable Insights Tumor Panel και του συστήματος GeneReader®. Όλα τα δείγματα εμπλουτίστηκαν με επιτυχία και δημιουργήθηκαν βιβλιοθήκες. Ποσοστό μεγαλύτερο του 98% των ενδείξεων που δημιουργήθηκαν αντιστοιχίστηκε στο ανθρώπινο γονιδίωμα και ποσοστό >99,8% των θέσεων στις περιοχές ενδιαφέροντος είχε κάλυψη βάσης $\geq 500x$.

Για αμφότερα τα είδη νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA), καταδείχθηκε επιτυχής εφαρμογή καθοδικών (downstream) τεχνολογιών (Εικόνα 3).

	qPCR	ddPCR	RT-qPCR	NGS
K2EDTA	✓	✓	✓	✓
PAXgene	✓	✓	δεν υποβλήθηκε σε δοκιμασία	✓
Streck	✓	✓	δεν υποβλήθηκε σε δοκιμασία	✓

Εικόνα 3. Επιτυχής χρήση απομονωμένων νουκλεϊκών οξέων με διαφορετικές καθοδικές (downstream) εφαρμογές.

Ο χρήστης θα πρέπει να βελτιστοποιήσει τον όγκο εισαγωγής πλάσματος και τον όγκο έκλουσης για το μόριο-στόχο, καθώς και οποιοσδήποτε μεταγενέστερες διαδικασίες που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριό του ή να ανατρέξει στις ειδικές επιδόσεις της σχετικής καθοδικής (downstream) εφαρμογής.

Σταθερότητα εκλουσμάτων

Η σταθερότητα των εκλουσμάτων θα εξαρτηθεί από το περιεχόμενο και τον τύπο των απομονωμένων νουκλεϊκών οξέων, τον όγκο έκλουσης και τις συνθήκες αποθήκευσης. Συνιστάται οι χρήστες να καθορίζουν τη σταθερότητα των εκλουσμάτων, όπως απαιτείται, με βάση τις ιδιαίτερες απαιτήσεις τους.

Η σταθερότητα των εκλουσμάτων ελέγχθηκε για DNA και εκλούσματα που προέρχονταν από ανθρώπινο πλάσμα το οποίο δημιουργήθηκε από BD Vacutainer K2EDTA Tube (Becton Dickinson and Company) και σωληνάρια συλλογής αίματος για σταθεροποίηση (PAXgene Blood ccfDNA Tube και Streck Cell-Free DNA BCT). Τα εκλούσματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασίες -30°C έως -15°C και -90°C έως -65°C . Δεν παρατηρήθηκε υποβάθμιση για έως και 12 μήνες. Τα εκλούσματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία $2-8^{\circ}\text{C}$ και σε θερμοκρασία δωματίου ($15-25^{\circ}\text{C}$) διατήρησαν τη σταθερότητά τους για έως και 48 ώρες. Όλες οι συνθήκες αξιολογήθηκαν με τη χρήση qPCR η οποία στόχευε το ανθρώπινο γονίδιο 18S rDNA.

Η σταθερότητα του εκλούσματος ελέγχθηκε για RNA και εκλούσματα που προέρχονταν από ανθρώπινο πλάσμα το οποίο δημιουργήθηκε από σωληνάρια BD Vacutainer K2EDTA Tube (Becton Dickinson and Company). Τα εκλούσματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασίες -30°C έως -15°C και -90°C έως -65°C . Δεν παρατηρήθηκε υποβάθμιση για έως και 6 μήνες. Τα εκλούσματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία $2-8^{\circ}\text{C}$ διατήρησαν τη σταθερότητά τους για έως και 48 ώρες. Όλες οι συνθήκες αξιολογήθηκαν με τη χρήση RT-qPCR η οποία στόχευε το ανθρώπινο γονίδιο της β-ακτίνης.

Εάν το kit χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με καθοδικές (downstream) εφαρμογές QIAGEN, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο kit για οδηγίες.

Ακρίβεια της απομόνωσης NO

Η ακρίβεια αξιολογήθηκε με τη χρήση ανθρώπινου πλάσματος, ενώ οι συνθήκες αξιολογήθηκαν με τη χρήση qPCR που στόχευε το ανθρώπινο γονίδιο 18S rDNA.

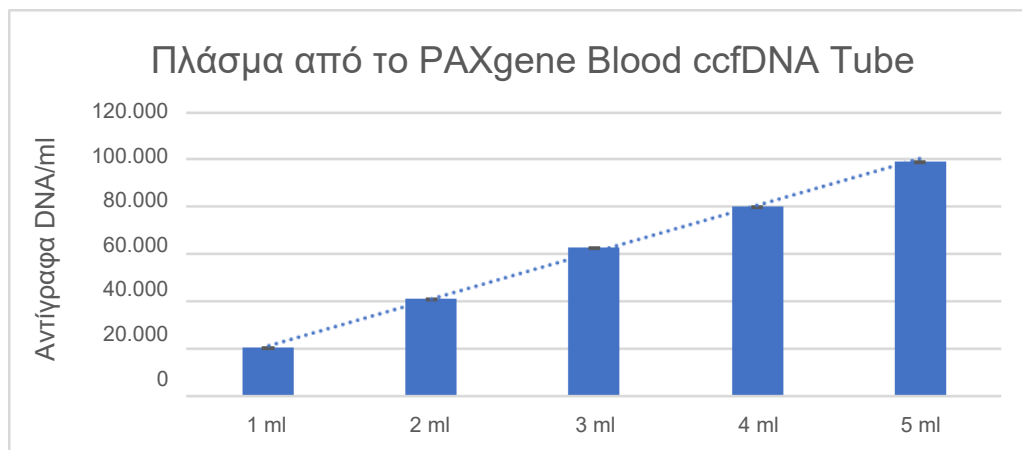
Η προετοιμασία πειράματος περιελάμβανε 12 εκτελέσεις καθαρισμού με 12 επαναλήψεις η καθεμία (συνολικά 144 καθαρισμοί). Οι εκτελέσεις καθαρισμού πραγματοποιήθηκαν από τρεις διαφορετικούς χειριστές, σε τρεις διαφορετικές ημέρες, με τρία διαφορετικά όργανα, με τη χρήση τριών διαφορετικών παρτίδων του QIAamp DSP Circulating NA Kit. Η τυπική απόκλιση (Standard Deviation, SD) και ο συντελεστής διακύμανσης (Coefficient of Variation, CV) προσδιορίστηκαν για κάθε μεμονωμένη παράμετρο και για τη συνολική μεταβλητότητα (σύνολο) του QIAamp DSP Circulating NA Kit (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Αποτελέσματα ακρίβειας

Ακρίβεια			
Παράμετρος	Μέσα αντίγραφα/ml	SD	CV (%)
Από εκτέλεση σε εκτέλεση		461	1,78
Από χειριστή σε χειριστή		1392	5,38
Από όργανο σε όργανο		228	0,88
Από ημέρα σε ημέρα	25.894	2096	8,09
Από παρτίδα σε παρτίδα		969	3,74
Σύνολο		3120	12,05

Γραμμικότητα

Έχουν δημιουργηθεί δεδομένα για όγκο εισαγωγής πλάσματος 1–5 ml που αποθηκεύτηκε σε σωληνάρια BD Vacutainer K2EDTA Tube, PAXgene Blood ccfDNA Tube και Streck Cell-Free DNA BCT. Για όλα τα BCT, παρατηρήθηκε γραμμική αύξηση της απόδοσης DNA (βλ. Εικόνα 4). Για τα σωληνάρια BD Vacutainer K2EDTA Tube, παρατηρήθηκε επίσης το ίδιο για το RNA.



Εικόνα 4. Γραμμική αύξηση της απόδοσης ολικού DNA (αντίγραφα DNA/ml εισαγωγής πλάσματος) για διαφορετικούς όγκους εισαγωγής πλάσματος. Απεικόνιση δεδομένων για το πλάσμα που δημιουργήθηκε από PAXgene Blood ccfDNA Tube, ισοδύναμα αποτελέσματα για το πλάσμα που προερχόταν από BD Vacutainer K2EDTA Tube (DNA/RNA) και Streck Cell-Free DNA BCT.

Ισοδυναμία πρωτοκόλλων (πρωτόκολλο Breeze/κλασικό πρωτόκολλο)

Η ισοδυναμία στις επιδόσεις μεταξύ του πρωτοκόλλου Breeze και του κλασικού πρωτοκόλλου προσδιορίστηκε αφού καταδείχθηκε ότι το αντίστοιχο όριο εμπιστοσύνης 95% της διαφοράς στη μέση τιμή Ct (RNA) ή στα μέσα αντίγραφα/ml (DNA) βρισκόταν εντός του $\pm 2 \times \text{STD}$, με την STD να είναι η παρατηρούμενη ακρίβεια του κλασικού πρωτοκόλλου (συνθήκη αναφοράς). Χρησιμοποιήθηκαν τρεις παρτίδες κιτ και τρεις χειριστές εκτέλεσαν τα πειράματα.

Η συνολική ακρίβεια (STD) των τιμών Ct που δημιουργήθηκαν για το πρωτόκολλο Breeze ήταν μικρότερη από το άνω άκρο του αμφίπλευρου διαστήματος πρόβλεψης 95% για τη συνολική ακρίβεια (STD) του κλασικού πρωτοκόλλου, όπου το διάστημα πρόβλεψης υπολογίστηκε στο πλαίσιο της μελέτης με τη χρήση των δεδομένων από το κλασικό πρωτόκολλο ($n = 143$) και με τη χρήση του αριθμού σημείων δεδομένων για το πρωτόκολλο Breeze ($n = 144$) στη μελέτη.

Παρεμβαλλόμενες ουσίες

Δυνητικώς παρεμβαλλόμενες ουσίες μπορούν να προέρχονται από διάφορες πηγές, για παράδειγμα, φυσικούς μεταβολίτες, ουσίες που εισάγονται κατά τη διάρκεια της θεραπείας του ασθενούς ή ουσίες που προσλαμβάνει ο ασθενής. Για το QIAamp DSP Circulating NA Kit, η αιμοσφαιρίνη, τα τριγλυκερίδια, το EDTA, η καφεΐνη, η λευκωματίνη, η συζευγμένη χολερυθρίνη και η μη συζευγμένη χολερυθρίνη υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ως ενδογενή συστατικά. Δεν διαπιστώθηκε παρεμβολή κατά τη διενέργεια qPCR ως καθοδικής (downstream) εφαρμογής. Επιπλέον, καμία παρεμβολή δεν προήλθε από συστατικά του QIAamp DSP Circulating NA Kit (πρωτεΐνάση K, Buffer ACL, Buffer ACB, Buffer ACW1, Buffer ACW2 και αιθανόλη) κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του δείγματος, ενώ παρατηρήθηκε εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων.





Λόγω του σύνθετου χαρακτήρα των δυνητικώς παρεμβαλλόμενων ουσιών και της διαφορετικής ευαισθησίας της εκάστοτε καθοδικής (downstream) εφαρμογής, συνιστούμε οι χρήστες να αξιολογούν την επίδραση παρεμβαλλόμενων ουσιών ειδικά για τη ροή εργασιών τους και να επικυρώνουν μια μέθοδο για τον έλεγχο των παρεμβολών στη διαγνωστική καθοδική (downstream) εφαρμογή που χρησιμοποιούν.

Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με παρεμβαλλόμενες ουσίες σε συγκεκριμένες καθοδικές (downstream) εφαρμογές QIAGEN, ανατρέξτε στα σχετικά εγχειρίδια kit.

Διασταυρούμενη μόλυνση

Για την αξιολόγηση του επιπέδου διασταυρούμενης επιμόλυνσης, 5 ή 2 ml ανθρώπινου πλάσματος αίματος εμβολιάστηκαν με 105 αντίγραφα ιού HBV (θετικά δείγματα) και απομονώθηκαν δίπλα σε δείγματα που δεν περιείχαν ιό (αρνητικά δείγματα) σε ρύθμιση τύπου σκακιέρας όπου πραγματοποιούταν εναλλαγή με εκτελέσεις εκχύλισης που περιείχαν μόνο αρνητικά δείγματα (για την αξιολόγηση της διασταυρούμενης επιμόλυνσης εντός και μεταξύ των εκτελέσεων εκχύλισης). Στόχος της μελέτης ήταν η μίμηση της κατάστασης κατά την οποία τα δείγματα που περιέχουν υψηλό επίπεδο μορίων-στόχων ενός νουκλεϊκού οξέος μπορούν να προκαλέσουν διασταυρούμενη επιμόλυνση σε άλλα δείγματα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκχύλισης. Ο καθαρισμός των NO πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μίας παρτίδας αντιδραστηρίων. Η διασταυρούμενη επιμόλυνση αξιολογήθηκε με τη χρήση του *artus*[®] HBV RG CE PCR Kit. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν μηδενική διασταυρούμενη επιμόλυνση σε ολόκληρο το σύστημα.

Σύμβολα

	Το προϊόν πληροί τις απαιτήσεις του Ευρωπαϊκού Κανονισμού 2017/746 για τα in vitro διαγνωστικά ιατροτεχνολογικά προϊόντα.
	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Αριθμός καταλόγου
	Κατασκευαστής
Rn	Το R αφορά στην αναθεώρηση των Οδηγιών χρήσης (Χαρακτηριστικά απόδοσης) και το n είναι ο αριθμός αναθεώρησης

Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου

Αναθεώρηση	Περιγραφή
R1, Ιούνιος 2022	Ενημέρωση για συμβατότητα του QIAamp DSP Circulating Kit V2 με τις απαιτήσεις IVDR Προσθήκη του όρου «χειροκίνητη» απομόνωση στην προοριζόμενη χρήση. Καμία μεταβολή στα δεδομένα απόδοσης σε σύγκριση με την έκδοση 1 του kit.

Για ενημερωμένες πληροφορίες σχετικά με τις άδειες χρήσης και για δηλώσεις αποποίησης ευθύνης σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, βλ. το αντίστοιχο εγχειρίδιο kit ή εγχειρίδιο χρήστη της QIAGEN. Τα εγχειρίδια kit και τα εγχειρίδια χρήστη της QIAGEN είναι διαθέσιμα στον ιστότοπο www.qiagen.com. Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της QIAGEN ή τον αντιπρόσωπο της περιοχής σας.

Εμπορικά σήματα: 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 ή οι θυγατρικές της). Οι καταχωρισμένες ονομασίες, τα εμπορικά σήματα, κ.λπ., που χρησιμοποιούνται στο παρόν έγγραφο, δεν θα πρέπει να θεωρούνται μη προστατευόμενα από τον νόμο, ακόμα και αν αυτό δεν υποδεικνύεται ρητώς.

06/2022 HB-3049-D01-001 © 2022 QIAGEN, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

