



Kesäkuu 2022

QIAsymphony® DSP DNA Kit -sarjan käyttöohje (suorituskykyominaisuudet)

Versio 2

IVD

In vitro -diagnostiikkaan

Käytettäväksi QIAsymphony DSP DNA Mini Kit- ja QIAsymphony DSP DNA Midi Kit -sarjan kanssa



REF

937236, 937255



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Saksa

R1

Suorituskykyominaisuudet ovat saatavilla sähköisessä muodossa tuotesivun lisämateriaalivälilehdessä osoitteessa www.qiagen.com.

Johdanto

QIASymphony DSP DNA Kit -sarjat on tarkoitettu käytettäväksi vain yhdessä QIASymphony SP -laitteen kanssa.

QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjat sisältävät reagensseja automaattiseen kokonais-DNA:n puhdistukseen ihmisen kokoverestä, buffy coat -kerroksesta, kudoksista ja formaliinilla kiinnitetyistä, parafiiniin upotetuista kudosnäytteistä (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) sekä virusten DNA:n puhdistamiseen ihmisen kokoverestä. QIASymphony DSP DNA Midi Kit -sarjat sisältävät reagensseja automaattiseen kokonais-DNA:n puhdistamiseen ihmisen kokoverestä ja buffy coat -kerroksesta. Kaikkien näytteenottoputkien tai kudostyyppien suorituskykyominaisuuksia ei kuitenkaan ole määritetty, ja käyttäjän täytyy validoida ne.

Magneettisia hiukkasia hyödyntävä tekniikka mahdollistaa korkealaatuisen nukleiinihappojen puhdistamisen, kun nukleiinihappoissa ei ole proteiineja, nukleaaseja tai muita epäpuhtauksia. Puhdistetut nukleiinihapot ovat valmiita käytettäväksi suoraan myöhemmissä sovelluksissa, kuten monistusreaktioissa (PCR). QIASymphony SP suorittaa kaikki puhdistustoimenpiteen vaiheet. Enintään 96 näytettä 24 näytteen erissä käsitellään yhdessä ajossa.

Seuraavassa on esitetty valikoituja suorituskykytietoja eri käyttösovelluksista.

Suorituskykyominaisuudet

Huomautus: Suorituskykyominaisuudet riippuvat paljolti useista tekijöistä ja liittyvät tiettyyn myöhempään käyttösovellukseen. Ne on määritetty QIASymphony DSP DNA Mini- ja Midi Kit -sarjoille yhdessä esimerkinomaisten myöhempien käyttösovellusten kanssa. Nukleiinihappojen eristämisen menetelmiä biologisista näytteistä käytetään kuitenkin alkuvaiheena useille myöhemmille käyttösovelluksille. Suorituskykyparametrit, kuten ristikontaminaatio tai ajon tarkkuus, on määritettävä sellaiselle työnkululle osana myöhempää käyttösovelluksen kehitystä. Siksi on käyttäjän vastuulla validoida koko työnkulku ja määrittää sopivat suorituskykyparametrit.

Perussuorituskyky ja yhteensopivuus erilaisten myöhempien käyttösovellusten kanssa

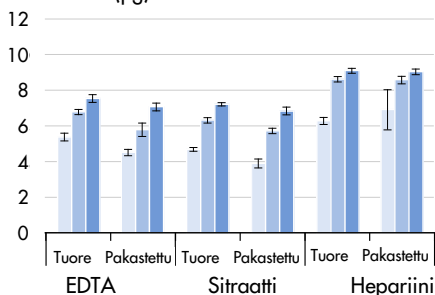
DNA, veri ja buffy coat

DNA:n tuotto

QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjan perussuorituskyky arvioitiin käyttämällä eri näytteenottoputkia ja antikoagulantteja sekä tuoretta ja pakastettua ihmisen kokoverta. Kokoverta otettiin kolmelta terveeltä luovuttajalta (valkosolumäärä [WBC] $4,0-11,0 \times 10^6$ solua/ml) kolmeen erityyppiseen putkeen: EDTA, 10 ml BD™ Vacutainer® 16 x 100 mm (K2-EDTA); sitraatti, 2,7 ml Sarstedt® S-Monovette® 9NC -putki 13 x 75 mm (sitraatti); hepariini, 7,5 ml Sarstedt S-Monovette 15 x 92 mm (Li-Heparin). Veri käytettiin joko tuoreena (säilytettynä 2–8 °C:ssa) tai pakastettuna (säilytettynä –20 °C:ssa). Genominen DNA puhdistettiin 200 µl:n näytteistä 4 replikaatilla luovuttajaa ja putken tyyppiä kohti käyttämällä QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjaa ja 200 DSP -protokollaa sekä eluutiotilavuutta 200 µl. DNA:n tuotto ja puhtaus määritettiin spektroskooppianalyysillä (kuva 1).

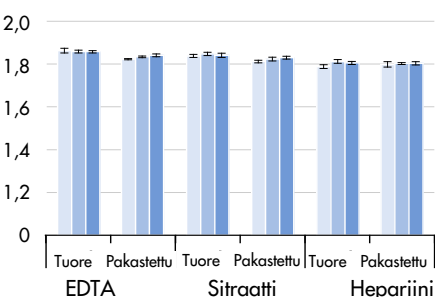
A

DNA:n tuotto (µg)



B

A_{260}/A_{280}

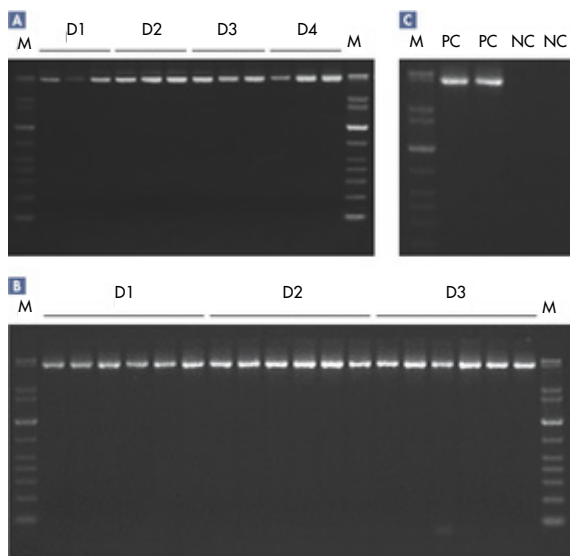


■ Luovuttaja 1 ■ Luovuttaja 2 ■ Luovuttaja 3

Kuva 1. DNA:n tuotto ja puhtaus käytettäessä eri näytteenottoputkia ja antikoagulantteja sekä tuoretta ja pakastettua ihmisen kokoverta. A DNA:n tuotto, palkit esittävät absoluuttisen DNA:n tuoton sekä keskihajonnan. **B** DNA:n puhtaus, palkit esittävät DNA:n puhtauden sekä keskihajonnan.

DNA:n eheys

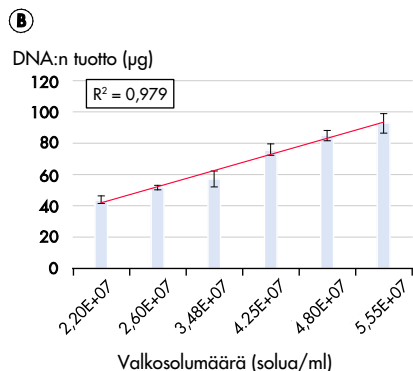
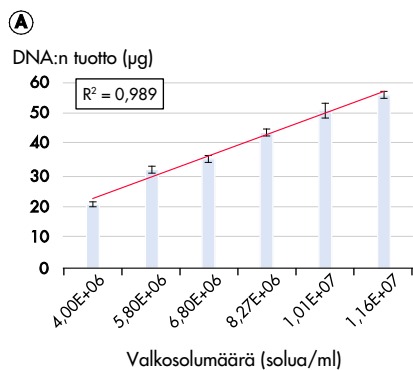
Pitkän alueen PCR-tuotteet (5 kb) monistettiin LongRange PCR -määrityksellä (kuva 2).



Kuva 2. DNA:n eheys testattuna pitkän alueen PCR:llä. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder. **A** Kokoveri oli peräisin 4 terveeltä luovuttajalta (D) BD K2E -putkissa. Pitkän alueen PCR:ää varten genominen DNA puhdistettiin 200 µl:n alikvooteista kolmena kappaleena käyttämällä QIAsymphony DSP DNA Mini Kit -sarjaa ja veren 200 DSP -protokollaa sekä eluutiotilavuutta 200 µl. D1 = luovuttaja 1, D2 = luovuttaja 2, D3 = luovuttaja 3 ja D4 = luovuttaja 4. **B** Kokoveri oli peräisin 3 terveeltä luovuttajalta BD K2E -putkissa ja buffy coat valmistettiin. Genominen DNA puhdistettiin 200 µl:n alikvooteista kuutena kappaleena käyttämällä QIAsymphony DSP DNA Mini Kit -sarjaa ja buffy coat -kerroksen 200 DSP -protokollaa sekä eluutiotilavuutta 200 µl. D1 = luovuttaja 1, D2 = luovuttaja 2 ja D3 = luovuttaja 3. **C** Kontrollit: PC = positiivinen kontrolli ja NC, negatiivinen kontrolli.

DNA:n tuoton korrelaatio valkosolumäärään

QIAsymphony DSP DNA Blood- ja Buffy Coat -sovellusten suorituskyky arvioitiin käyttämällä veri- ja buffy coat -näytteitä, joissa oli kuusi erilaista valkosolumäärää kullekin näytetyypille. Kokoveren osalta valkosolumäärät olivat 4×10^6 solua/ml – $11,6 \times 10^6$ solua/ml ja buffy coat -näytteen osalta määrät olivat $2,2 \times 10^7$ solua/ml – $5,6 \times 10^7$ solua/ml. DNA:n tuotot määritettiin spektroskopia-analyysillä ja niitä verrattiin valkosolumäärään (kuva 3).



Kuva 3. DNA:n tuoton korrelaatio valkosolumäärään. **A** Genominen DNA puhdistettiin 1 ml:n ihmisen kokoverinäytteistä käyttämällä QIASymphony DSP DNA Midi Kit -sarjaa ja veren 1000 DSP -protokollaa sekä eluutiotilavuutta 500 µl. Palkit esittävät absoluuttisen DNA:n tuoton ja keskihajonnan. **B** Genominen DNA puhdistettiin 400 µl:n buffy coat -näytteistä käyttämällä QIASymphony DSP DNA Midi Kit -sarjaa ja buffy coat -kerroksen 400 DSP -protokollaa sekä eluutiotilavuutta 400 µl. Palkit esittävät absoluuttisen DNA:n tuoton ja keskihajonnan.

Virusveri

Osumatarkkuustutkimukset tehtiin laimentamalla esikvantifioitu CMV WHO -vakiomateriaali CMV-negatiivisella ihmisen kokoverellä. Havaitsemisaste 100 % havaittiin näytteissä, joiden viruskuorma oli 90 IU CMV:tä / ml (taulukko 1).

Taulukko 1. QIASymphony DSP Virus Blood -sovelluksen herkkyys

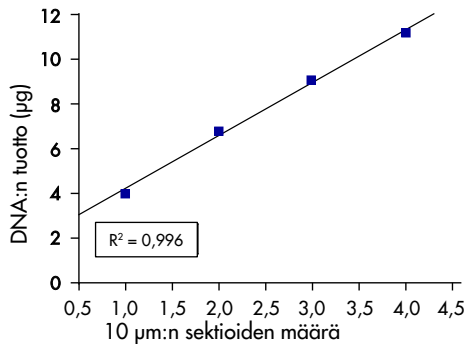
CMV (IU/ml)	Replikaatit	Osumat	Osumat (%)
350	18	18	100,00
230	32	32	100,00
115	31	31	100,00
90	32	32	100,00
60	30	24	80,00
30	30	15	50,00
15	30	10	33,33
6	21	5	23,81
2	21	2	9,52
0	15	0	0,00

Ihmisen kokoveri kerättiin 1 terveeltä CMV-negatiiviselta luovuttajalta BD K2E -putkeen ja siihen lisättiin CMV WHO -vakiomateriaalia käyttämällä eri tittereitä. Viruksen DNA puhdistettiin käyttämällä QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjaa ja virusveren 200 DSP -protokollaa sekä eluutiotilavuutta 60 µl. Eluaatit analysoitiin CMV:n reaaliaikaisella PCR-määrittelyllä.

Kudos ja FFPE-kudos

DNA:n tuotto

QIASymphony DSP DNA FFPE-kudossovelluksen suorituskyky arvioitiin käyttämällä kuutta replikaattia 1–4, 10 µm:n, FFPE-sektioista äskettäin leikatusta ihmisen pernasta. DNA eristettiin QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjalla kudoksen vähäisen sisällön DSP-protokollan avulla. Deparafinointi ja lyysaus tehtiin ksyleeni-/etanoliesikäsittelyllä. DNA eluoiitiin 50 µl:aan eluutiopuskuria ja DNA:n tuotto määritettiin spektroskopia-analyysillä (kuva 4).



Kuva 4. DNA:n tuoton korrelaatio FFPE-kudossektioiden määrään. Kuusi 1–4, 10 µm:n, FFPE-kudossektion (ihmisen pernasta) replikaattia deparafinoitiin ksyleeni-/etanoliesikäsittelyllä. DNA eristettiin QIASymphony SP -laitteella QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjalla kudoksen vähäisen sisällön DSP-protokollan avulla käyttämällä eluutiotilavuutta 50 µl.

Biomarkkereiden mutaatiotilan analyysi real-time PCR:llä

Biomarkkereiden mutaatiotilan analyysi tehtiin käyttämällä ihmisen koolonista tehdyistä FFPE-sektioista eristettyä DNA:ta ja ihmisen keuhkokudosnäytteistä eristettyä DNA:ta.

DNA:n eristämisessä FFPE-kudosnäytteistä näytteiden valmisteluun käytettiin 3 x 10 µm:n sektiota ihmisen koolonista. DNA:n eristys tehtiin käyttämällä Deparaffinization Solution -liuosta esikäsittelyyn ja kudoksen pienen sisällön DSP-protokollaa yhdessä 100 µl:n eluutiotilavuuden kanssa. KRAS-biomarkkerin mutaatioanalyysi tehtiin käyttämällä reaaliaikaista PCR-määrittystä KRAS:n tunnistamiseen määrittämisen käsikirjan mukaisesti. Kontrollimäärittämisen C_T -arvot olivat määritetyllä alueella ja mutaation havaitsemisanalyysi paljasti aminohapon substituution kodonissa 12, mikä osoitti ΔC_T -arvo 4,17, joka on alle määritetyn raja-arvon 8 12SER-mutaation havaitsemisessa (taulukko 2).

Taulukko 2. FFPE-kudoksen KRAS-biomarkkerin mutaatioanalyysin tulokset

Näyte	Reaktio	C _T -tavoite	Sisäisen kontrollin C _T	ΔC _T *
Malliton kontrolli	Kontrolli	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	-
Standardi	Kontrolli	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
FFPE-kudos (ihmisen koolon)	Kontrolli	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	-

* $\Delta C_T = M C_T - C C_T$, missä M = mutaatio ja C = kontrolli; n.d. = ei havaittu.

DNA:n eristämässä pakastetuista kudoksenäytteistä käytettiin 25 mg ihmisen keuhkokudosta näytteen valmisteluun sekä kudoksen runsaan sisällön DSP-protokollaa ja eluutiolavuutta 200 µl. EGFR-biomarkkerin mutaatioanalyysi tehtiin käyttämällä reaaliaikaista PCR-määrittystä EGFR:lle. Kontrollin ja mutaation havaitsemisen analyysi tehtiin määrittelyn käsikirjan kuvauksen mukaisesti. Tulokset paljastivat deleetion EGFR-geenissä, minkä osoitti ΔC_T -arvo 2,47, joka on alle määritetyn mutaation tunnistusrajan 12 (taulukko 3).

Taulukko 3. Pakastetun kudoksen EGFR-biomarkkerin mutaatioanalyysin tulokset

Näyte	Reaktio	C _T -tavoite	Sisäisen kontrollin C _T	ΔC _T *
Malliton kontrolli	Kontrolli	0,00	31,71	-
	T790M	0,00	32,36	-
	Deleetiot	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	-
Standardi	Kontrolli	28,78	31,05	-
	T790M	30,08	31,13	1,30
	Deleetiot	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
Kudos (ihmisen keuhko)	Kontrolli	25,76	31,23	-
	T790M	n.d.	31,99	-
	Deleetiot	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	-

* $\Delta C_T = M C_T - C C_T$, missä M = mutaatio ja C = kontrolli; n.d. = ei havaittu.

Toistettavuus ja uusittavuus

DNA-veri

DNA:n eristys tehtiin käyttämällä veren 200 DSP -protokollaa ja eluutiolavuutta 200 µl. Toistettavuus arvioitiin niin, että yksi käyttäjä teki kolme erillistä ajoa (96 näytettä kussakin) kolmena eri päivänä, ja jokainen ajo koostui 4 erästä ja 24 näytteestä (taulukot 4 ja 5).

Uusittavuus arvioitiin niin, että kolme käyttäjää teki kolme erillistä ajoa (96 näytettä kussakin) kolmena eri päivänä eri QIASymphony SP -laitteilla, ja jokainen ajo koostui 4 erästä ja 24 näytteestä (taulukot 6 ja 7).

Taulukko 4. Toistettavuusarvion tulokset

Ajo	Erä	n	Keskimääräinen DNA:n tuotto (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	5,17	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
Yhteensä	–	288	4,96	–	–

n = replikaattien määrä; SD = keskihajonta; CV = variaatiokerroin.

Taulukko 5. Toistettavuusarvion tarkkuustiedot

	SD	CV
Erästä erään saman ajon sisällä	0,25	4,95
Toistettavuustarkkuus yhteensä	0,26	5,18

SD, keskihajonta; CV, variaatiokerroin.

Taulukko 6. Uusittavuusarvion tulokset

Ajo	Erä	n	Keskimääräinen DNA:n tuotto (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
Yhteensä	–	288	5,38	–	–

n = replikaattien määrä; SD = keskihajonta; CV = variaatiokerroin.

Taulukko 7. Uusittavuusarvion tarkkuustiedot

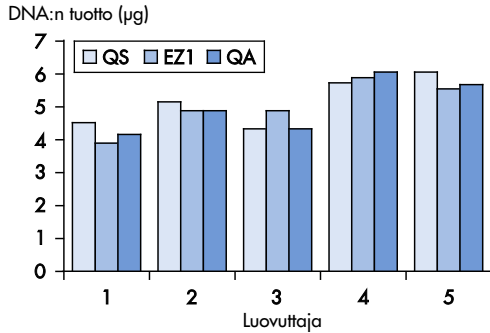
	SD	CV
Erästä erään saman ajon sisällä	0,25	4,73
Toistettavuustarkkuus yhteensä	0,38	7,03

SD, keskihajonta; CV, variaatiokerroin.

Vertailtava suorituskyky

DNA-veri

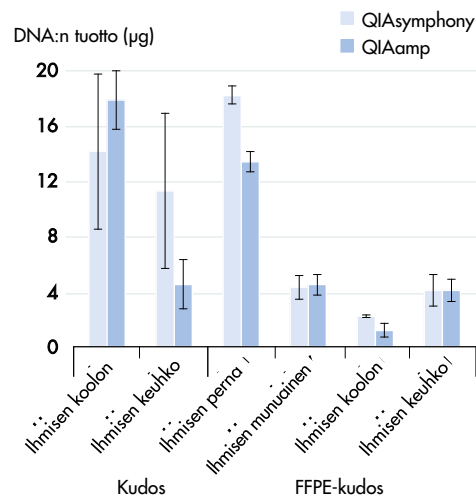
QIAasymphony DSP DNA verestä -järjestelmän suorituskyky analysoitiin vertaamalla EZ1® DSP DNA verestä -järjestelmää ja QIAamp® DNA Blood Mini Kit -oppaan valmistelutoimenpidettä. DNA puhdistettiin eri verinäytteistä ja DNA:n tuotto analysoitiin (kuva 5).



Kuva 5. DNA:n tuottojen vertailu veren DNA:n eri puhdistusjärjestelmien välillä. Kokoveri oli peräisin 5 terveeltä luovuttajalta BD K2E -putkissa. Kaikissa menetelmissä käytettiin 200 µl:n näytteen aloitustilavuuksia ja 200 µl:n eluutiotilavuuksia. QS = QIAasymphony DSP DNA Mini Kit ja veren 200 DSP -protokolla; EZ1 = EZ1 Advanced XL käyttämällä EZ1 DSP DNA Blood Kit -sarjaa; QA = QIAamp DNA Blood Mini Kit. Palkit esittävät absoluuttisen DNA:n tuoton per näyte.

Kudos ja FFPE-kudos

QIAasymphony DSP DNA Mini Kit -sarjan suorituskykyä verrattiin manuaalisen QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit -sarjan ja QIAamp DSP DNA Mini Kit -sarjan suorituskykyyn käyttämällä FFPE-kudosta ja tuoretta ja pakastettua kudosta näytemateriaalina. Manuaaliset ja automaattiset näytteen valmistelut sekä DNA:n tuoton kvantifiointi tehtiin samanaikaisesti. DNA:n tuotto eristyksen jälkeen tuoreista/pakastetuista ja FFPE-käsitellyistä kudostenäytteistä QIAasymphony DSP DNA Mini Kit -sarjalla, QIAamp DSP DNA Mini Kit (kudos) -sarjalla ja QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (FFPE-kudos) -sarjalla on esitetty kuvassa 6.



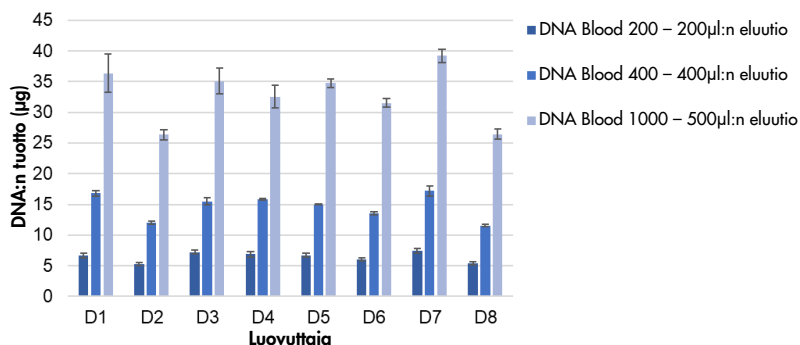
Kuva 6. DNA:n eristäminen kudostenäytteistä ja FFPE-kudostenäytteistä. Tuoreen/pakastetun kudoksen osalta ihmisen keuhko- ja koolonkudoksen näytteet leikattiin 6 x 25 mg:n palaksi. Näytteen valmistelussa käytettiin kolme palaa kutakin kudostyyppiä käyttämällä QIAasymphony SP -laitetta ja kudoksen runsaan sisällön DSP-protokollaa. Jäljelle jääneiden näytteiden DNA:n eristäminen tehtiin käyttämällä QIAamp DSP DNA Mini Kit -sarjaa. DNA eluutiin 200 µl:aan ja DNA:n tuotto määritettiin spektroskopia-analysillä. FFPE-kudoksen DNA:n eristämiseen valmisteltiin 12 replikaattia, joissa oli 3 x 10 µm:n FFPE-kudossektiota ihmisen eri elimistä. Kuutta näytettä käytettiin näytteen valmistelussa käyttämällä QIAasymphony SP -laitetta ja Deparaffinization Solution -esikäsitteilyä ja kudoksen vähäisen sisällön DSP-protokollaa. Jäljelle jääneiden näytteiden DNA:n eristäminen tehtiin käyttämällä QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit -sarjaa. DNA eluutiin 50 µl:aan ja DNA:n tuotto määritettiin spektroskopia-analysillä. Palkit esittävät absoluuttisen DNA:n tuoton ja keskihajonnan.

Näytteiden syöttöalue / eluaatin tuottoalue

DNA-veri

DNA:n verisovelluksen eri näytteen syöttöaluetta ja eluaatin tuottoaluetta verrattiin käyttämällä näytteitä luovuttajilta, joiden valkosolumäärä vaihteli välillä $5,0\text{--}8,0 \times 10^6$ solua/ml.

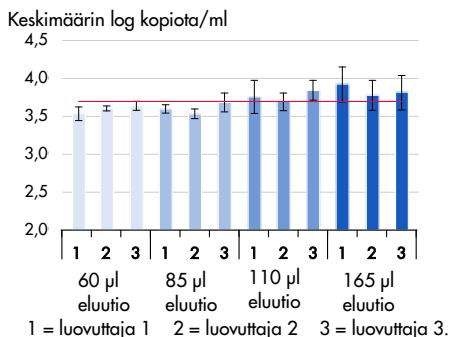
Kokoveri oli peräisin 8 terveeltä luovuttajalta BD K2E -putkissa. DNA puhdistettiin kuudesta replikaatista, jokaisessa käytettiin QIASymphony DSP DNA Mini/Midi Kit -sarjaa ja DNA blood 200 DSP -protokollaa sekä 200 µl:n eluutiotilavuutta, DNA blood 400 DSP -protokollaa ja 400 µl:n eluutiotilavuutta sekä DNA blood 1000 DSP -protokollaa ja 500 µl:n eluutiotilavuutta (kuva 7).



Kuva 7. Veren DNA-puhdistusjärjestelmien näytteen eri lähtömäärän ja eluutiotilavuuden vertailu. Kokoveri oli peräisin 8 terveeltä luovuttajalta BD K2E -putkissa. DNA:n eristys tehtiin käyttämällä DNA blood 200 -protokollaa ja 200 µl:n eluutiotilavuutta, DNA blood 400 -protokollaa ja 400 µl:n eluutiotilavuutta sekä DNA blood 1000 -protokollaa ja 500 µl:n eluutiotilavuutta. DNA:n tuotto määritettiin spektroskopia-analyysillä. Palkit esittävät absoluuttisen DNA:n tuoton (keskiarvon ja keskihajonnan) luovuttajakohtaisesti.

Virusveri

Kokoverinäytteet kerättiin kolmelta terveeltä luovuttajalta, joiden valkosolumäärä vaihteli välillä $4,0\text{--}11,0 \times 10^6$ solua/ml, BD K2E -putkiin ja niihin lisättiin CMV-vakiomateriaalia (titteri $3,7 \log$ kopiota/ml). Viruksen DNA puhdistettiin 7 replikaatista, kaikki käyttämällä QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjaa ja virusveren 200 DSP -protokollaa sekä neljää eri eluutiotilavuutta (kuva 8).



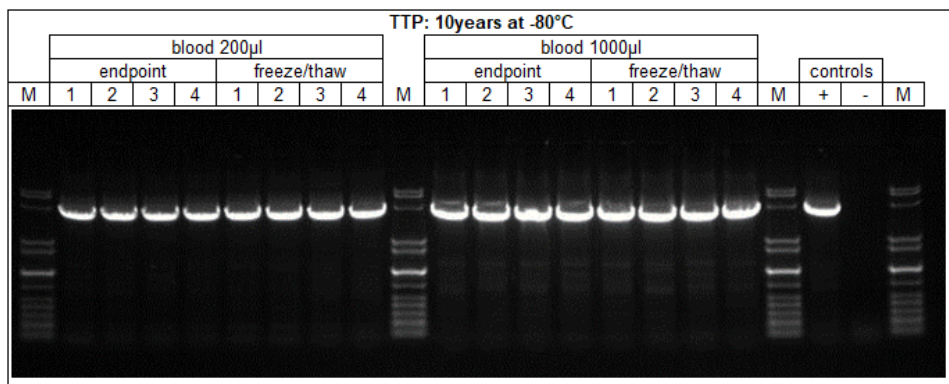
Kuva 8. Viruksen DNA:n kvantifoinnin vertailu eri eluutiotilavuuksissa. Kunkin näytteen eluaatit ja eluutiotilavuudet (60 µl, 85 µl, 110 µl ja 165 µl) analysoitiin CMV:n reaaliaikaisella PCR-määrityksellä. Punainen viiva esittää tavoitetitteriä ja palkit esittävät keskimääräisen log-kopiomäärän millilitraa kohti sekä keskihajonnan.

Eluaatin vakaus

Huomautus: Eluaatin vakaus riippuu paljolti erilaisista tekijöistä ja liittyy kyseiseen myöhempään käyttötarkoitukseen. Ne on määritetty QIASymphony DSP Mini- ja Midi Kit -sarjoille yhdessä esimerkinomaisten myöhempien käyttösovellusten kanssa. On käyttäjän vastuulla katsoa käyttöohjeista tietoa laboratoriossa käytettävästä kyseisestä myöhemmästä käyttötarkoituksesta ja/tai validoida koko työnkulku sopivien säilytysolosuhteiden määrittämiseksi.

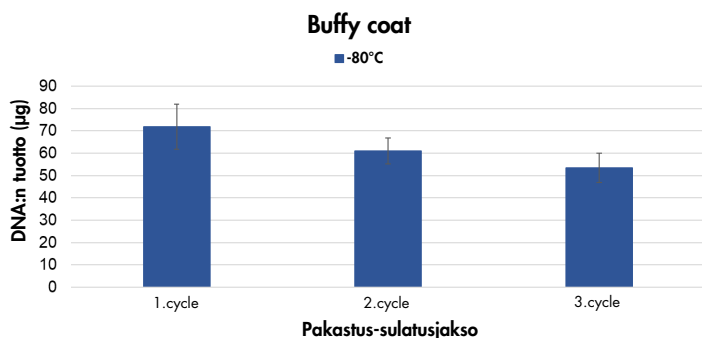
DNA, veri ja buffy coat

DNA-verisovelluksen eluaatin vakaus testattiin käyttämällä eluaatteja QS-ajoista, jotka tehtiin DNA Blood 200 -protokollalla ja 200 µl:n eluutiotilavuudella ja DNA Blood 1000 -protokollalla ja 500 µl:n eluutiotilavuudella. Eluaatteja säilytettiin 2 ml:n Sarstedt Tube -putkissa huoneenlämmössä, 2–8 °C:ssa, –20 °C:ssa ja –80 °C:ssa. DNA:n tuotto ja puhtaus määritettiin spektroskopia-analysillä. DNA:n eheys analysoitiin geelielektroforeesilla ja LongRange PCR -määrityksellä (kuva 9).



Kuva 9. DNA-veren eluaatin vakaus. DNA puhdistettiin käyttämällä DNA Blood 200 µl- ja 1000 µl -protokollia. Eluaatteja on säilytetty –80 °C:ssa 2 ml:n Sarstedt Tube -putkissa. Neljä replikaattia analysoitiin. DNA:n eheys testattiin pitkän alueen PCR:llä. Kuvat esittävät tulokset 10 vuoden säilytyksen jälkeen. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder.

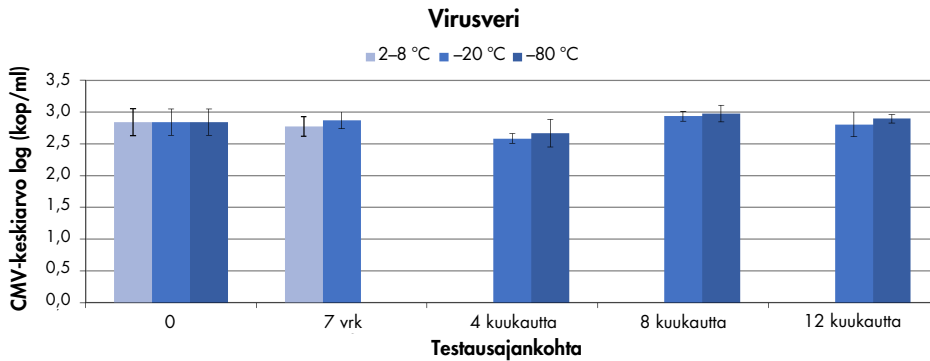
Eluaatin vakautta buffy coat -sovelluksessa testattiin käyttämällä eluaatteja QS-ajoista, jotka tehtiin BC 400 µl -protokollalla ja 200 µl:n eluutiotilavuudella. Eluaatteja säilytettiin 2 ml:n Sarstedt Tube -putkissa ja eluution mikroputkikelineissä huoneenlämmössä, 2–8 °C:ssa, –20 °C:ssa ja –80 °C:ssa. Lisäksi eluaatit altistettiin pakastus-/sulatusjaksoille enintään kolmessa jaksossa (kuva 10). DNA:n tuotto ja puhtaus määritettiin spektroskooppianalysillä. DNA:n eheys analysoitiin geelielektroforeesilla ja LongRange PCR -määrityksellä (50 µl:n reaktio).



Kuva 10. Eluaatin pakastus-sulatusjaksot buffy coat -kerroksen osalta. DNA puhdistettiin käyttämällä DNA BC 400 µl -protokollaa. Buffy coat generoitiin EDTA-verestä. Eluaatteja on säilytetty 2 ml:n Sarstedt Tube -putkissa. DNA:n tuotto määritettiin testausajankohdissa käyttämällä samaa eluaattia kolmessa pakastus-sulatusjaksossa. DNA:n tuotto määritettiin spektroskopia-analysillä. Palkit esittävät absoluuttisen DNA:n tuoton (keskiarvon ja keskihajonnan).

Virusveri

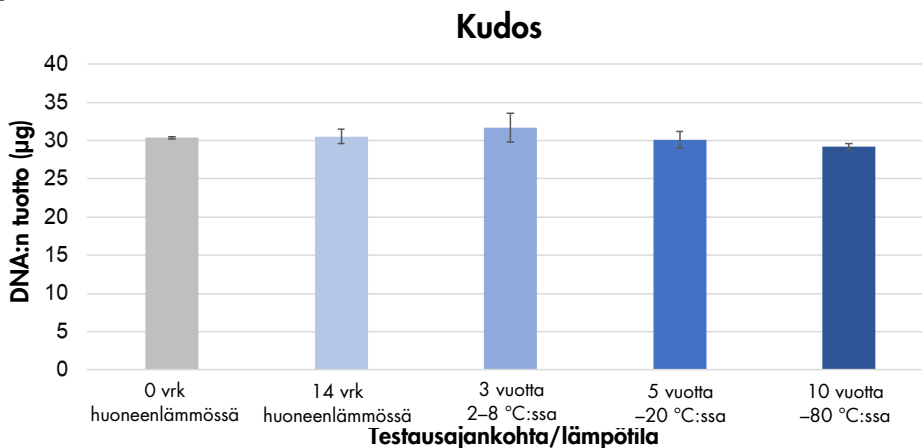
Eluaatin vakautta virusverisovelluksessa testattiin käyttämällä eluaatteja QS-ajoista, jotka tehtiin Virus Blood 200 -protokollalla ja 60 µl:n eluutiotilavuudella. K₂ EDTA -verta, johon oli lisätty kaupallista CMV-standardia (titteri 2,7 log kopiota/ml), käytettiin näytemateriaalina. Eluaatteja säilytettiin 2 ml:n Sarstedt Tube -putkissa 2–8 °C:ssa, –20 °C:ssa ja –80 °C:ssa. Eluaatit analysoitiin käyttämällä CMV:n reaaliaikaista määrittystä (kuva 11). Seuraavassa on esitetty useiden testausajankohtien tulokset.



Kuva 11. Eluaatin vakaus virusverisovelluksessa. EDTA-verinäytteet, joihin oli lisätty kaupallista CMV-standardia, puhdistettiin Virus Blood 200 -protokollalla. Eluaatteja on säilytetty useissa lämpötiloissa eluutiomikroputkelineissä ja 2 ml:n Sarstedt Tube -putkissa. Testausajankohtaa kohden analysoitiin neljä replikaattia. Palkit esittävät CMV-titterin (keskimääräisen log-arvon ja keskihajonnan).

Kudos

Eluaatin vakautta kudossovelluksessa testattiin käyttämällä Tissue HC 200 µl -protokollaa ja 200 µl:n eluutiotilavuutta. Tuoretta naudan maksaa käytettiin näytemateriaalina. Eluaatteja säilytettiin 2 ml:n Sarstedt Tube -putkissa ja eluution mikroputkelineissä huoneenlämmössä, 2–8 °C:ssa, –20 °C:ssa ja –80 °C:ssa. DNA:n tuotto ja puhtaus määritettiin spektroskopia-analyysillä (Kuva 12). DNA:n eheys analysoitiin geelielektroforeesilla.

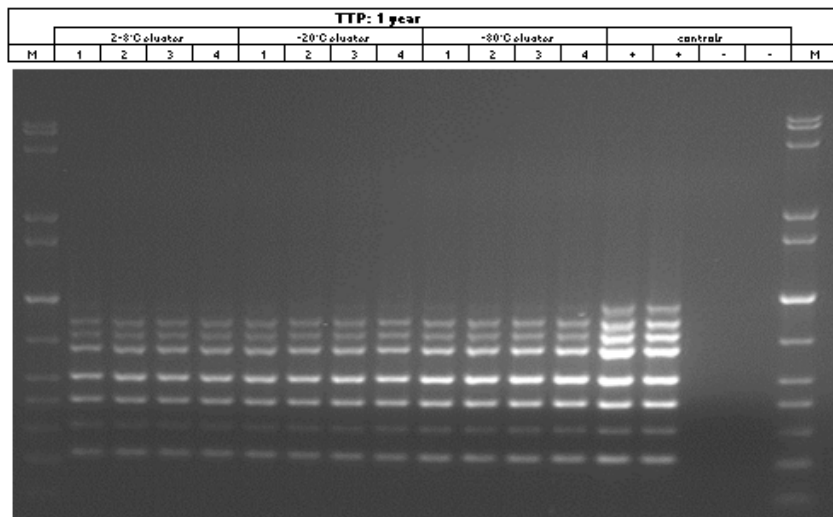


Kuva 12. Eluaatin vakaus kudoksen osalta. DNA puhdistettiin käyttämällä DNA Tissue HC -protokollaa ja 200 µl:n eluutiotilavuutta. Tuoretta naudan maksaa käytettiin näytemateriaalina. Eluaatteja on säilytetty useissa lämpötiloissa eluutiomikroputkelineissä ja 2 ml:n Sarstedt Tube -putkissa. Testausajankohtaa kohden analysoitiin neljä replikaattia. DNA:n tuotto määritettiin spektroskopia-analyysillä. Palkit esittävät absoluuttisen DNA:n tuoton (keskiarvon ja keskihajonnan).

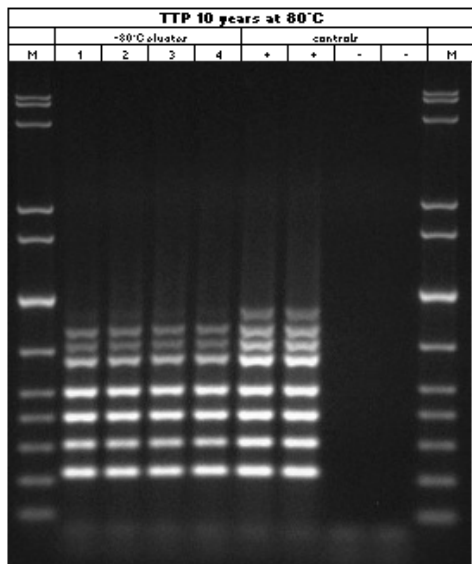
FFPE-kudos

Eluaatin vakautta FFPE-kudossovelluksessa testattiin käyttämällä Tissue LC 200 µl -protokollaa ja 100 µl:n eluutiotilavuutta. Kaupallista ihmisen FFPE-kudosta käytettiin näytemateriaalina. Eluaatteja säilytettiin 2 ml:n Sarstedt Tube -putkissa ja eluution mikroputkelineissä huoneenlämmössä, 2–8 °C:ssa, –20 °C:ssa ja –80 °C:ssa. Eluaatit analysoitiin talon sisäisellä ihmisen 8-plex PCR-määrityksellä (kuva 13). Seuraavassa on esitetty kahden testausajankohdan tulokset.

A:



B:



Kuva 13. FFPE-kudoksen eluaatin vakaus. DNA puhdistettiin käyttämällä DNA Tissue LC -protokollaa. Kaupallista FFPE-kudosta käytettiin näytemateriaalina. Eluaatteja on säilytetty useissa lämpötiloissa eluutiomikroputkelineissä ja 2 ml:n Sarstedt Tube -putkissa. Testausajankohtaa kohden analysoitiin neljä replikaattia. Eluaatit analysoitiin talon sisäisellä ihmisen 8-plex PCR-määrityksellä.

Häiritsevät aineet

Kokoveressä mahdollisesti esiintyvien inhiboivien aineiden vaikutus DNA-verisovelluksen, virusverisovelluksen ja kudossovelluksen suorituskykyyn testattiin lisäämällä seuraavia aineita:

Taulukko 8. Mahdollisesti häiritsevät aineet, jotka testattiin eri sovelluksissa

Häiritsevät aineet	Pitoisuus	Veri	Virusveri	Kudos
Bilirubiini	200 mg/l	√	√	√
Hemoglobiini	200 g/l	√	√	
Triglyseridit	30 g/l	√	√	√
Proteiini	120 g/l	√	√	√

Huomautus: "√" osoittaa, mitkä näytemateriaalit testattiin asianomaisen mahdollisesti häiritsevän aineen osalta.

Hemoglobiinin (200 g/l) ja proteiinin (120 g/l) osalta verinäytteen olemassa olevat tasot määritettiin ja hemoglobiinia tai proteiinia lisättiin indikoidun pitoisuuden saavuttamiseksi (200 tai 120 g/l). Bilirubiinin (200 mg/l) ja triglyseridien (30 g/l) osalta kunkin aineen kokonaismäärä lisättiin näytteisiin indikoidun pitoisuuden saavuttamiseksi.

Kudoksen osalta kunkin aineen kokonaismäärä lisättiin suoraan lysaatteihin eikä bilirubiinin, triglyseridin tai proteiinipitoisuuden määrittystä tehty käytetylle kudoksenäytteelle.

Kaikki mahdollisesti häiritsevät aineet (esim. lääkkeet) ja vastaava pitoisuus on erittäin riippuvainen myöhemmästä käyttösovelluksesta ja potilaan mahdollisista aiemmista lääkehoidoista, ja ne on tutkittava sellaisen myöhemmän käyttösovelluksen varmistuksen yhteydessä käyttämällä QIASymphony DSP DNA Mini- ja Midi Kit -sarjoja.

Huomautus: Testaus tehtiin käyttämällä esimerkinomaisia myöhempiä käyttösovelluksia eristettyjen nukleiinihappojen laadun arvioimiseen. Erilaisilla myöhemmillä käyttösovelluksilla voi kuitenkin olla erilaiset vaatimukset puhtauden suhteen (ts. mahdollisesti häiritsevien aineiden puuttuminen tai pitoisuus) niin, että asianomaisten aineiden tunnistus ja testaus ja liittyvät pitoisuudet on myös määritettävä osana myöhemmän käyttösovelluksen kehitystä kaikissa työkuluissa, joissa käytetään QIASymphony DSP Mini- ja Midi Kit -sarjoja.

Huomautus: Huomaa, että QIASymphony DSP DNA Midi Kit -sarjan kehityksen aikana ei havaittu indikaatioita, että hepariinilla olisi negatiivinen vaikutus suorituskykyyn. ISO 20186-2:2019(E) kuitenkin totetaa, että näytteenottoputkien hepariini saattaa vaikuttaa eristettyjen nukleiinihappojen puhtauteen ja mahdollinen siirtyminen eluaatteihin voi aiheuttaa inhibitioita joissakin myöhemmissä käyttösovelluksissa. Siten on käyttäjän vastuulla validoida, onko hepariinilla negatiivinen vaikutus työnkulkuun.

DNA, veri ja buffy coat

DNA-verisovelluksissa testaus tehtiin käyttämällä DSP DNA 1000 -protokollaa, joka kattaa suurimman näytteiden lähtötilavuuden, käyttämällä 200 ja 500 µl:n eluutiilavuuksia.

Eluaattien DNA:n tuotto ja puhtaus analysoitiin spektroskopia-analyysillä. PCR-yhteensopivuus testattiin käyttämällä real-time PCR:ää sekä päätepisteen PCR-määrittystä.

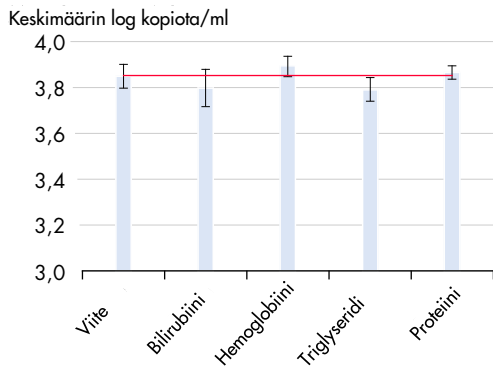
Mikään taulukossa 9 luetelluista aineista ei ole häiritsevää; suuren pitoisuuden triglyseridejä (> 30 g/l) sisältävät verinäytteet voivat kuitenkin aiheuttaa gDNA-tuoton pienenemisen.

Virus blood

Virusverikäyttösovelluksessa testaus tehtiin käyttämällä DSP Virus Blood 200 -protokollaa ja 60 µl:n eluutiilavuutta. CMV-negatiivisiin verinäytteisiin lisättiin 500 kopiota/ml (pieni pitoisuus) ja 1×10^4 kopiota/ml (suuri pitoisuus, kuva 14) kaupallista CMV-standardia.

Eluaatit analysoitiin CMV:n real-time PCR -määrityksellä.

Mikään taulukossa 9 luetelluista aineista ei ole häiritsevää; suuren pitoisuuden triglyseridejä (> 30 g/l) sisältävät verinäytteet voivat kuitenkin aiheuttaa viruksen DNA:n puhdistuksen heikkenemisen.



Kuva 14. Inhiboivan aineen testi. Kokoverinäytteet kerättiin yhdeltä terveeltä luovuttajalta BD K2E -putkiin ja niihin lisättiin CMV-vakiomateriaalia (titteri 4,0 log kopiota/ml). Viisi näytettä testattiin lisäämällä mahdollisia inhibiittoreita ja viruksen DNA puhdistettiin kunkin näytteen neljästä replikaatista käyttämällä QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjaa ja virusveren 200 DSP -protokollaa sekä eluutiilavuutta 165 µl. Eluaatit analysoitiin CMV:n reaaliaikaisella PCR-määrityksellä. Punainen viiva esittää viitenäytteiden määritettyä titteriä. Viitenäytteisiin ei lisätty inhiboivia aineita. Palkit esittävät keskimääräistä log-kopiomäärää/ml sekä keskihajontaa.

Kudos

DNA-kudoksen (tuoreen ja pakastetun) osalta testaus tehtiin käyttämällä DSP DNA HC -protokollaa ja 200 µl:n eluutiilavuutta.

Eluaattien DNA:n tuotto ja puhtaus analysoitiin spektroskopia-analyysillä. PCR-yhteensopivuutta testattiin käyttämällä real-time PCR -määritystä.

Millään taulukossa 9 luetelluista aineista ei ollut negatiivista vaikutusta näytteen valmisteluun.

FFPE-kudos

FFPE-kudoksen osalta testaus tehtiin käyttämällä DSP DNA LC -protokollaa ja 50 µl:n eluutiilavuutta.

Aineet (katso taulukko 9) lisättiin suoraan lysaattiin.

Taulukko 9. Mahdollisesti häiritsevät aineet, jotka testattiin eri sovelluksissa

Häiritsevät aineet	Pitoisuus lysaatissa
Ksyleeni	Enintään 11 %
Etanoli	Enintään 11 %
Deparafinisaatioliuos	Enintään 11 %
Parafiini	0,1 µM:n pala

Eluaattien DNA:n tuotto ja puhtaus analysoitiin spektroskopia-analyysillä. PCR-yhteensopivuus testattiin käyttämällä real-time PCR:ää sekä talon sisäistä ihmisen 8-plex PCR -määrittystä.

Millään taulukossa 9 luetelluista aineista ei ollut negatiivista vaikutusta näytteen valmisteluun.

Ristikontaminaatio





DNA-veri

QIASymphony DNA-verikäyttösovelluksen ristikontaminaation riski analysoitiin suorittamalla neljä 96 näytteen ajoa QIASymphony SP -laitteella vuorottaisilla shakkiruutuerillä (positiivisten ja negatiivisten näytteiden vuorottelu), minkä keskeyttivät täysin negatiiviset erät. Miehen verta (jonka valkosolumäärä oli $\geq 1,0 \times 10^7$ solua/ml) ja naisen verta (jonka valkosolumäärä oli välillä $4,0 \times 10^6 - 9 \times 10^6$ solua/ml) käytettiin mallijärjestelmänä. Näytteet valmistettiin käyttämällä veren 1000 µl:n protokollaa, joka kattaa suurimman näytemäärän. Naisten negatiivisten näytteiden mahdollinen kontaminaatio eristysajojen aikana arvioitiin analysoimalla eluaateista myöhemmin Y-kromosomin esiintyminen real-time PCR -määrittelyllä.

Ristikontaminaatiota ei havaittu näytteiden, erien tai ajojen välisenä siirtymänä.

Symbolit

Tässä asiakirjassa käytetään seuraavia symboleja. Täydellinen luettelo käyttöohjeissa tai pakkauksessa ja merkinnöissä käytetyistä symboleista on käsikirjassa.

Symboli	Selitys
	Tämä tuote täyttää in vitro -diagnostisia lääkinnällisiä laitteita koskevan eurooppalaisen säännöksen 2017/746 vaatimukset.
	Diagnostinen in vitro -lääkintälaitte
	Tuotenumero
Rn	R tarkoittaa käyttöohjeiden versiota, ja n on versionumero
	Valmistaja

Muutoshistoria

Versio	Kuvaus
R1, heinäkuu 2022	Versio 2, versio 1 <ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="619 402 1107 427">• Päivitys versioon 2 IVDR-noudatusta varten<li data-bbox="619 449 1321 508">• Osiot Häiritsevät aineet, Ristikontaminaatio, Eluaatin vakaus ja Yhteensopivuus myöhempien käyttösovellusten kanssa lisättiin

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat ovat saatavilla osoitteesta www.qiagen.com tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä palvelusta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Tavaramerkit: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, QIAamp®, EZ1®, UltraRun® (QIAGEN Group); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.). Tässä asiakirjassa mainittuja rekisteröityjä nimiä, tavaramerkkejä jne. on pidettävä lain suojaamina, vaikkei niitä olisi erityisesti sellaisiksi merkitty.

06/2022 HB-3029-D01-001 © 2022 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

