

Komplekti QIASymphony[®] DSP DNA Kit Kasutusjuhised (Sooritusnäitajad)

2. versioon



Kasutamiseks *in vitro* diagnostikas

Kasutamiseks komplektidega QIASymphony DSP DNA Mini Kit ja QIASymphony DSP DNA Midi Kit



937236, 937255



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Saksamaa

R1

Sooritusnäitajad on saadaval elektrooniliselt ja on leitavad tootelehe ressursside vahelehel veebilehel www.qiagen.com.

Sissejuhatus

Komplektid QIASymphony DSP DNA Kit on ette nähtud kasutamiseks üksnes koos analüsaatoriga QIASymphony SP.

Komplektid QIASymphony DSP DNA Mini Kit annavad reaktiivid kogu DNA automaatseks puhastamiseks inimese täisverest, trombotsüütide-leukotsüütide kihist, koest ja formaliinis fikseeritud, parafiini sukeldatud (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) koeproovidest, samuti viirusliku DNA puhastamiseks inimese täisverest. Komplektid QIASymphony DSP DNA Midi Kit sisaldavad reaktiive kogu DNA automaatseks puhastamiseks inimese täisverest ja trombotsüütide-leukotsüütide kihist. Iga verevõtukatsuti või koeliigi sooritusnäitajaid ei ole siiski kindlaks määratud ja neid peab hindama kasutaja.

Magnetosakeste tehnoloogia võimaldab puhastada kõrge kvaliteediga nukleiinhappeid, mis ei sisalda valke, nukleaase ega muid lisandeid. Puhastatud nukleiinhapped on valmis otseks kasutuseks järelrakendustes, nt amplifitseerimisreaktsioonid (PCR). Analüsaator QIASymphony SP teostab puhastamisprotseduuride kõik etapid. Ühes tööseerias töödeldakse kuni 96 proovi kuni 24 partiis.

Järgnevalt näidatakse valitud sooritusandmeid erinevate rakenduste jaoks.

Sooritusnäitajad

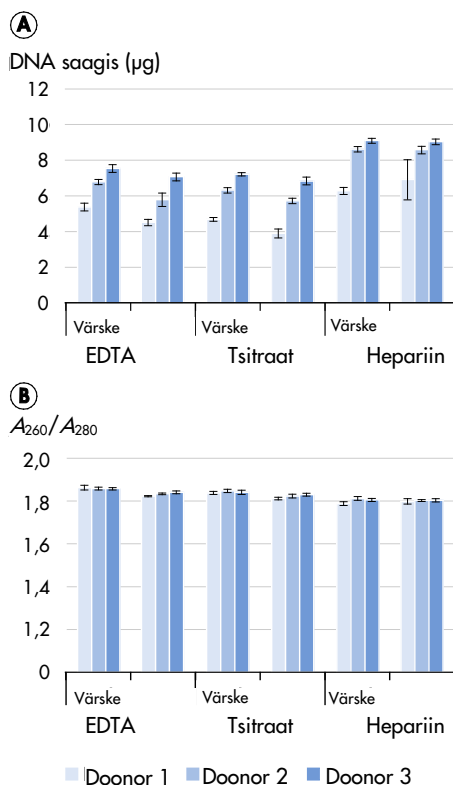
Märkus. Sooritusnäitajad sõltuvad suuresti erinevatest teguritest ja on seotud spetsiifilise järelrakendusega. Need on kindlaks määratud komplektide QIASymphony DSP DNA Mini ja Midi Kit jaoks koos näitlike järelrakendustega. Kuid nukleiinhapete isoleerimise meetodeid bioloogilistest proovidest kasutatakse eelkõige mitmes järelrakenduses. Sooritusparameetrid, nt ristsaastumine või käitustäpsus, tuleb kindlaks määrata töövoos osana järelrakenduse seadistamisest. Seepärast on kasutaja kohustatud valideerima kogu töövoos, et kindlaks määrata asjakohased sooritusparameetrid.

Põhisooritus ja -ühilduvus erinevate järelrakendustega

DNA veri ja trombotsüütide-leukotsüütide kiht

DNA saagis

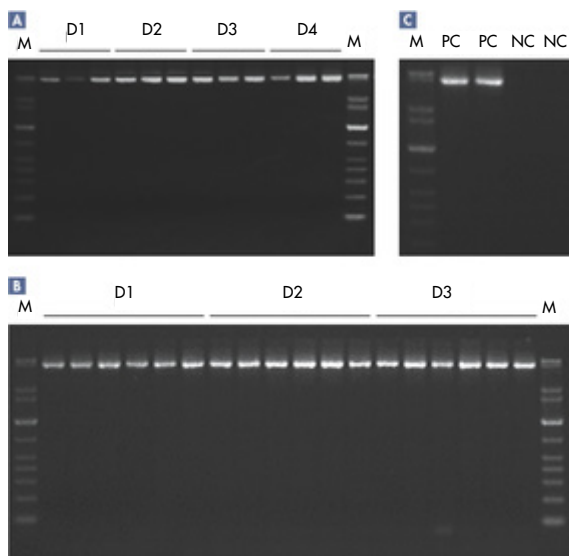
Komplekti QIASymphony DSP DNA Mini Kit põhisooritust evalueeriti, kasutades erinevaid verevõtukatsuteid ja antikoagulante ning samuti inimese värsket ja külmutatud täisverd. Täisverd võeti 3 tervelt doonorilt (valgete vereliblede [WBC] arv 4,0 kuni 11,0 x 10⁶ raku/ml) 3 eri tüüpi katsuti: EDTA, 10 ml BD™ Vacutainer® 16 x 100 mm (K2-EDTA); tsitraat, 2,7 ml Sarstedt® S-Monovette® 9NC katsuti 13 x 75 mm (tsitraat); hepariin, 7,5 ml Sarstedt S-Monovette 15 x 92 mm (Li-hepariin). Kasutati kas värsket (säilitustemperatuur 2–8 °C) või külmutatud (säilitustemperatuur –20 °C) verd. Genoomne DNA puhastati 200 µl proovidest 4 replikaadiga doonori ja katsuti liigi kohta, kasutades komplekti QIASymphony DSP DNA Mini Kit ja vere 200 DSP protokollide elueerimismahuga 200 µl. DNA saagised ja puhtus määrati kindlaks spektroskoopilise analüüsiga (joonis 1).



Joonis 1. DNA saagis ja puhtus, kasutades erinevaid proovivõtukatsuteid ja antikoagulante inimese värsket ja külmutatud täisverega. A DNA saagis, ribad näitavad absoluutset DNA saagist standardhälbega. B DNA puhtus, ribad näitavad DNA puhtust standardhälbega.

DNA terviklikkus

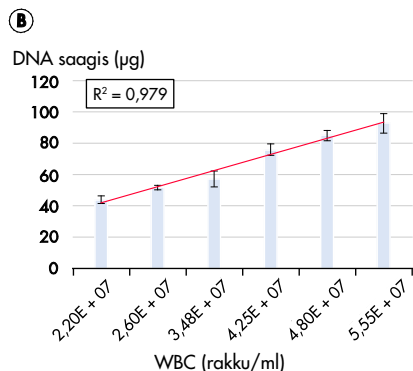
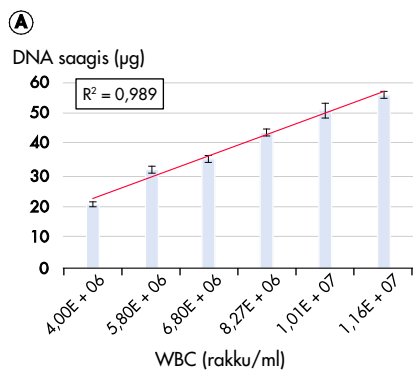
Amplifitseeriti pikaajalisi PCR-tooteid (5 kb), kasutades analüüsi LongRange (joonis 2).



Joonis 2. DNA terviklikkus, mida testiti pikaajalise PCR-iga. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder. **A** Täisveri koguti neljalt tervelt doonorilt (D) katsutitesse BD K2E. Pikaajalise PCR-i genomne DNA puhastati kolmes eksemplaris 200 µl alikvootidest, kasutades komplekti QIASymphony DSP DNA Mini Kit ja vere 200 DSP protokolliga elueerimismahuga 200 µl. D1 = doonor 1, D2 = doonor 2, D3 = doonor 3 ja D4 = doonor 4. **B** Täisveri koguti 3 tervelt doonorilt BD K2E katsutitesse ja valmistati trombotsüütide-leukotsüütide kiht. Genomne DNA puhastati 6 eksemplaris 200 µl alikvootidest, kasutades komplekti QIASymphony DSP DNA Mini Kit ja trombotsüütide-leukotsüütide kihi 200 DSP protokolliga elueerimismahuga 200 µl. D1, doonor 1, D2, doonor 2 ja D3, doonor 3. **C** Kontrollproovid: PC = positiivne kontrollproov ja NC = negatiivne kontrollproov.

DNA saagise ja WBC arvu korrelatsioon

Komplekti QIASymphony DSP DNA vere ja leukotsüütide kihi rakenduste sooritust hinnati, kasutades iga prooviliigi jaoks 6 erineva WBC arvu vere- ja trombotsüütide-leukotsüütide kihi proove. Täisvere WBC arvud olid vahemikus 4×10^6 rakku/ml kuni $11,6 \times 10^6$ rakku/ml ja trombotsüütide-leukotsüütide kihi arvud olid vahemikus $2,2 \times 10^7$ rakku/ml kuni $5,6 \times 10^7$ rakku/ml. DNA saagised määrati kindlaks spektroskoopilise analüüsiga ja leiti sõltuvus WCB arvust (joonis 3).



Joonis 3. DNA saagise ja WBC arvu korrelatsioon. A Genoomne DNA puhastati 1 ml inimese täisverest, kasutades komplekti QIASymphony DSP DNA Midi Kit ja vere 1000 DSP protokolliga elueerimismahuga 500 µl. Ribad näitavad absoluutset DNA saagist standardhälbega. B Genoomne DNA puhastati 400 µl trombotsüütide-leukotsüütide kihist, kasutades komplekti QIASymphony DSP DNA Midi Kit ja trombotsüütide-leukotsüütide kihi 400 DSP protokolliga elueerimismahuga 400 µl. Ribad näitavad absoluutset DNA saagist standardhälbega.

Viiruslik veri

Õnnestumise määra uuringud viidi läbi eelnevalt kvantifitseeritud CMV WHO standardmaterjali lahjendamisega inimese CMV-negatiivses täisveres. Tuvastamise määr 100% leiti proovidel, mille viiruskoormus oli CMV 90 RÜ milliliitri kohta (tabel 1).

Tabel 1. Rakenduse QIASymphony DSP Virus Blood tundlikkus

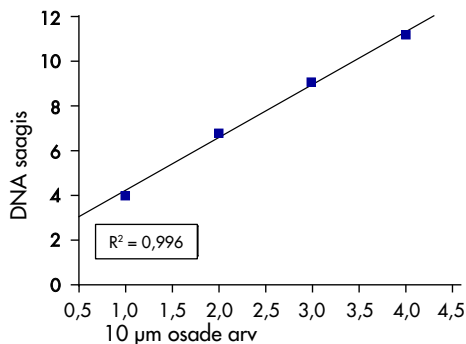
CMV (RÜ/ml)	Eksemplarid	Õnnestumised	Õnnestumiste %
350	18	18	100,00
230	32	32	100,00
115	31	31	100,00
90	32	32	100,00
60	30	24	80,00
30	30	15	50,00
15	30	10	33,33
6	21	5	23,81
2	21	2	9,52
0	15	0	0,00

Inimese täisveri koguti 1 tervelt CMV-negatiivsest doonorilt katsutitesse BD K2E ja sinna lisati CMV WHO standardmaterjali, kasutades erinevaid tiitreid. Viiruslik DNA puhastati, kasutades komplekti QIASymphony DSP DNA Mini Kit ja viirusliku vere 200 DSP protokolliga elueerimismahuga 60 µl. Eluaate analüüsiiti CMV-ga, kasutades analüüsi real-time PCR-i.

Kude ja FFPE kude

DNA saagis

QIAasymphony DSP DNA FFPE koe rakenduse sooritust hinnati, kasutades 1–4, 10 µm värskest lõigatud inimese põrna, FFPE osade 6 eksemplari. DNA ekstraheerimine teostati, kasutades komplekti QIAasymphony DSP DNA Mini Kit koos koe väikese sisaldusega DSP protokolliga. Deparafiinimine ja lüüsimine teostati ksüleeni/etanooli eeltöötuse meetodiga. DNA-d elueeriti 50 µl elueerimispuhvris ja DNA saagis määrati kindlaks spektroskoopilise analüüsiga (joonis 4).



Joonis 4. DNA saagise ja FFPE-koe sektsioonide korrelatsioon. Inimese põrna koe osade kuus replikaati 1–4, 10 µm, FFPE deparafineeriti ksüleeni/etanooli eeltöötusega. DNA ekstraheerimine teostati analüsaatoril QIAasymphony SP, kasutades komplekti QIAasymphony DSP DNA Mini Kit koos madala koesisaldusega DSP protokolliga ja elueerimismahuga 50 µl.

Biomarkerite mutatsioonistaatuse analüüs real-time PCR-iga.

Biomarkerite mutatsioonistaatuse analüüs viidi läbi, kasutades inimese käärsooles FFPE osadest ekstraheeritud DNA-d ja inimese kopsu koeproovidest ekstraheeritud DNA-d.

DNA ekstraheerimiseks FFPE koeproovidest kasutati proovi prepeareerimiseks inimese käärsoole osi $3 \times 10 \mu\text{m}$. DNA ekstraheerimine toimus deparafineerimislahuse Deparaffinization Solution kasutamisega eeltöötuseks ja väikese koesisaldusega DSP protokolliga koos 100 µl elueerimismahuga. Biomarkeri KRAS mutatsioonianalüüs teostati KRAS tuvastamiseks analüüs real-time PCR vastavalt komplekti käsiraamatule. Kontrollanalüüsi C_T väärtused olid määratletud vahemikus ja mutatsiooni tuvastamise analüüs näitas aminohappe asendust koodonis 12, mida näitas ΔC_T väärtus 4,17, mis on väiksem kui määratletud piirväärtus 8 mutatsiooni 12SER tuvastamiseks (tabel 2).

Tabel 2. FFPE koe KRAS-biomarkeri mutatsioonianalüüsi tulemused

Proov	Reaktsioon	Siht-C _T	Sisemise kontrolli C _T	ΔC _T *
Matriitsita kontrollproov	Kontroll	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	Kontroll	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-kude (inimese käärsool)	Kontroll	24,94	31,98	-
	12ALA	kindlaks määramata	32,42	-
	12ASP	kindlaks määramata	32,73	-
	12ARG	kindlaks määramata	33,05	-
	12CYS	kindlaks määramata	32,74	-
	12SER	29,11	32,34	4,17
	12VAL	kindlaks määramata	32,81	-
	13ASP	kindlaks määramata	33,20	-

* $\Delta C_T = M C_T - C C_T$, kus M = mutatsioon ja C = kontrollproov; n.d. = kindlaks määramata.

DNA ekstraheerimiseks külmutatud koeproovidest kasutati 25 mg inimese kopsukoe prepeareerimiseks, kasutades suure koesisaldusega DSP protokolliga ja elueerimismahtu 200 µl. Teostati EGFR-i biomarkeri mutatsioonianalüüs, kasutades EGFR-i jaoks analüüsi real-time PCR. Tehti mutatsiooni kontrollimise ja tuvastamise analüüs vastavalt analüüsi käsiraamatu kirjeldusele. Tulemused näitasid deletsiooni EGFR-geenis, nagu näitab ΔC_T väärtus 2,47, mis on väiksem kui mutatsiooni tuvastamise määratletud piirväärtus 12 (tabel 3).

Tabel 3. Külmutatud koe EGFR-biomarkeri mutatsioonianalüüsi tulemused

Proov	Reaktsioon	Siht-C _T	Sisemise kontrolli C _T	ΔC _T *
Matriitsita kontrollproov	Kontroll	0,00	31,71	-
	T790M	0,00	32,36	-
	Deletsioonid	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	Kontroll	28,78	31,05	-
	T790M	30,08	31,13	1,30
	Deletsioonid	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
Kude (inimese kops)	Kontroll	25,76	31,23	-
	T790M	kindlaks määramata	31,99	-
	Deletsioonid	28,23	30,99	2,47
	L858R	kindlaks määramata	31,33	-
	L861Q	kindlaks määramata	31,98	-
	G719X	kindlaks määramata	32,06	-
	S768I	kindlaks määramata	31,88	-
	Ins	kindlaks määramata	31,62	-

* ΔC_T = M C_T - C C_T, kus M = mutatsioon ja C = kontrollproov; n.d. = kindlaks määramata.

Korratavus ja reprodutseeritavus

DNA veri

Teostati DNA ekstraheerimine, kasutades vere 200 DSP protokolliga elueerimismahuga 200 µl. Korratavust hindas üks kasutaja, tehes 3 iseseisvat analüüsi (igas analüüsis 96 proovi) 3 erineval päeval, kusjuures iga analüüs sisaldas 4 partiid 24 prooviga (tabelid 4 ja 5).

Kolm erinevat kasutajat hindasid reprodutseeritavust 3 iseseisva analüüsiga (igas analüüsis 96 proovi) 3 erineval päeval erinevatel analüsaatoritel QIASymphony SP, kusjuures iga analüüs sisaldas 4 partiid 24 prooviga (tabelid 6 ja 7).

Tabel 4. Korratavuse hindamise tulemused

Tööseeria	Partii	n	Keskmine DNA saagis (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
Kokku	–	288	4,96	–	–

n = korduste arv; SD = standardhälve; CV = variatsioonikoeffitsient.

Tabel 5. Korratavuse hindamise täpsuse andmed

	SD	CV
Partiid samas analüüsis	0,25	4,95
Üldine kordamise täpsus	0,26	5,18

SD = standardhälve; CV = variatsioonikoeffitsient.

Tabel 6. Reprodutseeritavuse hindamise tulemused

Tööseeria	Partii	n	Keskmine DNA saagis (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
Kokku	–	288	5,38	–	–

n = korduste arv; SD = standardhälve; CV = variatsioonikoeffitsient.

Tabel 7. Reprodutseeritavuse hindamise täpsuse andmed

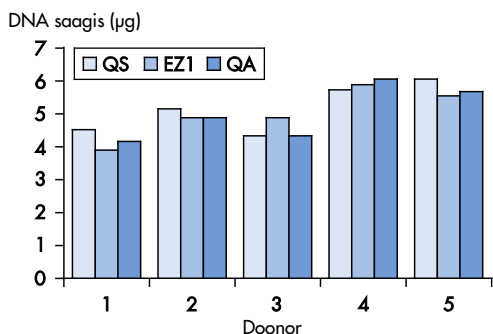
	SD	CV
Partiid samas analüüsis	0,25	4,73
Üldine kordamise täpsus	0,38	7,03

SD = standardhälve; CV = variatsioonikoeffitsient.

Võrdlev sooritus

DNA Blood

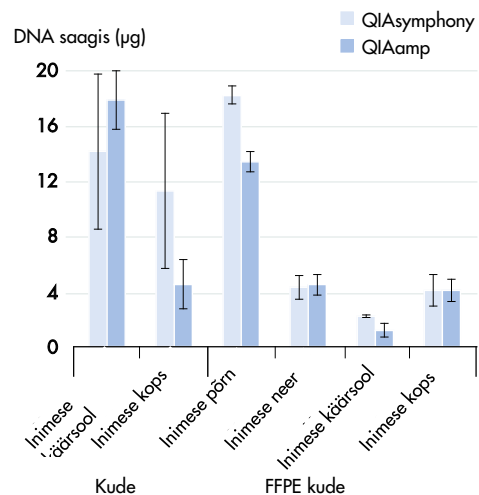
Sooritus analüüsiti QIAasymphony DSP DNA veresüsteemi jaoks, võrreldes EZ1® DSP DNA veresüsteemiga ja komplekti QIAamp® DNA Blood Mini Kit manuaalse prepareerimise protseduuriga. DNA puhastati erinevatest vereproovidest, analüüsiti DNA saagise suhtes (joonis 5).



Joonis 5. DNA saagiste võrdlemine erinevate vere DNA puhastussüsteemide vahel. Täisveri koguti 5 tervelt doonorilt katsutitesse BD K2E. Kõikide meetodite korral kasutati 200 µl proovi sisendmahtusid ja elueerimismahtusid 200 µl. QS = komplekt QIAasymphony DSP DNA Mini Kit ja vere 200 DSP protokoll; EZ1 = EZ1 Advanced XL, kasutades komplekti EZ1 DSP DNA Blood Kit; QA = komplekt QIAamp DNA Blood Mini Kit. Ribad näitavad iga proovi absoluutset DNA saagist.

Kude ja FFPE kude

Komplekti QIAasymphony DSP DNA Mini Kit sooritus võrreldi manuaalse komplekti QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit ja komplekti QIAamp DSP DNA Mini Kit sooritusega, kasutades proovimaterjaline vastavalt FFPE kude ning värsket ja külmutatud kude. Manuaalne ja automaatne proovide ettevalmistamine ja DNA saagiste kvantifitseerimine teostati ühel ajal. DNA saagised pärast ekstraheerimist värskest/külmutatud ja FFPE koeproovidest, kasutades komplekte QIAasymphony DSP DNA Mini Kit, QIAamp DSP DNA Mini Kit (kude) ja komplekti QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (FFPE kude) on kujutatud joonisel 6.



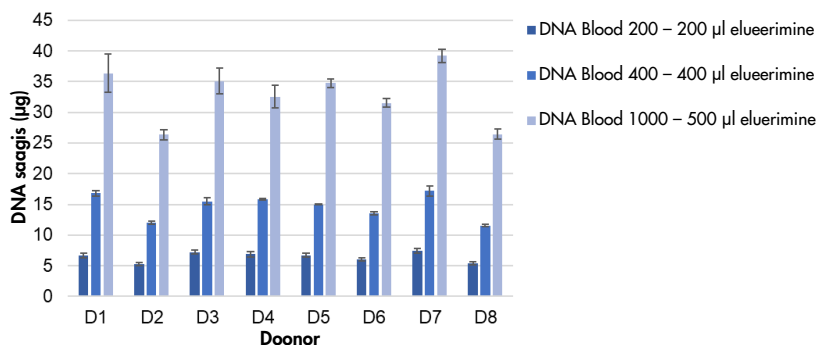
Joonis 6. DNA ekstraheerimine koe- ja FFPE koeproovidest. Värske/külmutatud koe jaoks lõigati inimese kopsu- ja käärissooleproovid 6 × 25 mg tükkideks. Iga koeliigi kolme tükki kasutati proovi prepareerimiseks, kasutades analüsaatorit QIAasymphony SP koos suure koesisaldusega DSP protokolliga. DNA ekstraheerimine ülejäänud proovidest teostati, kasutades komplekti QIAamp DSP DNA Mini Kit. DNA-d elueeriti 200 µl-is ja DNA saagis määrati kindlaks spektroskoopilise analüüsiga. DNA ekstraheerimiseks FFPE koest prepareeriti 12 replikaati, mis sisaldasid 3 × 10 µm FFPE koeosi erinevatest inimese elunditest. Proovi prepareerimiseks kasutati kuut proovi, kasutades analüsaatorit QIAasymphony SP koos deparaffinimislahuse Deparaffinization Solution eeltöötuse ja väikese koesisaldusega DSP protokolliga. DNA ekstraheerimine ülejäänud proovidest teostati, kasutades komplekti QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. DNA-d elueeriti 50 µl-is ja DNA saagis määrati kindlaks spektroskoopilise analüüsiga. Ribad näitavad absoluutset DNA saagist standardhõlbega.

Proovi sisestuse / eluaadi väljundi vahemik

DNA veri

Võrreldi erinevaid proovi sisestuse ja eluaadi väljundi vahemikke DNA vere rakenduse jaoks, kasutades veredoonoreid, kelle WBC arv oli vahemikus $5,0$ kuni $8,0 \times 10^6$ rakku/ml.

Täisveri koguti 8 tervelt doonorilt katsutitesse BD K2E. DNA puhastati 6 eksemplarist, kasutades iga kord komplekti QIASymphony DSP DNA Mini/Midi Kit ja DNA Blood 200 DSP protokolliga 200 μ l elueerimismahuga, DNA Blood 400 DSP protokolliga 400 μ l elueerimismahuga ja DNA Blood 1000 DSP protokolliga 500 μ l elueerimismahuga (Joonis 7).

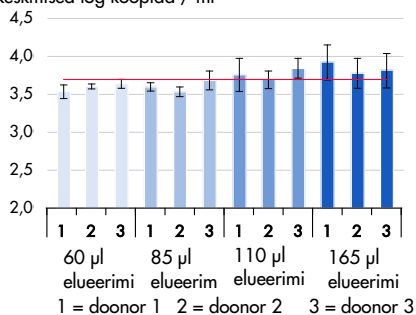


Joonis 7. Erinevate proovi sisendite ja elueerimismahude võrdlus vere DNA puhastussüsteemides. Täisveri koguti 8 tervelt doonorilt katsutitesse BD K2E. Teostati DNA ekstraheerimine, kasutades DNA vere 200 protokolliga elueerimismahuga 200 μ l, DNA vere 400 protokolliga elueerimismahuga 400 μ l ja DNA vere 1000 protokolliga elueerimismahuga 500 μ l. DNA saagis määrati spektroskoopilise analüüsiga. Ribad näitavad absoluutset DNA saagist iga doonori kohta (keskmine väärtus standardhälbega).

Viiruslik veri

Täisveri koguti 3 tervelt doonorilt, WBC arviga vahemikus $4,0$ kuni $11,0 \times 10^6$ rakku/ml, katsutitesse BD K2E ja sinna viidi CMV standardmaterjali (tiiter $3,7$ log koopiat / ml). Viiruslik DNA puhastati 7 eksemplarist, kasutades iga kord komplekti QIASymphony DSP DNA Mini Kit ja viirusliku vere 200 DSP protokolliga 4 erineva elueerimismahuga (joonis 8).

Keskmine log koopiad / ml



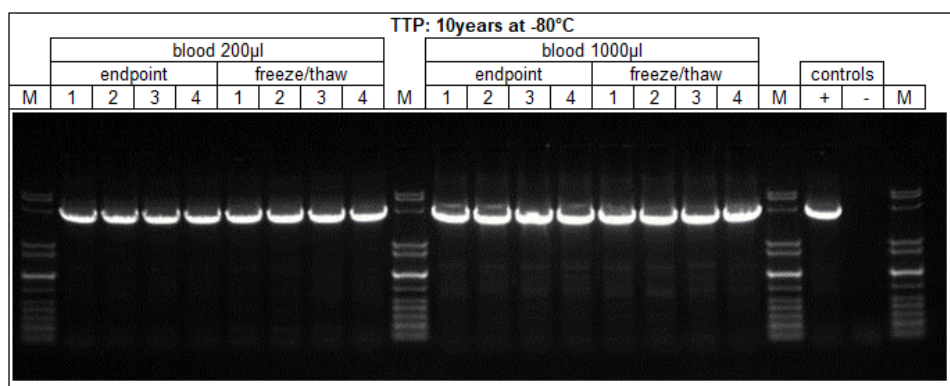
Joonis 8. Viirusliku DNA kvantifitseerimise võrdlemine erinevate elueerimismahude korral. Iga doonori proovi eluaate ja elueerimismahuga (60, 85, 110 ja 165 μ l) analüüsiti komplekti CMV analüüsiga real-time PCR. Punane joon esindab sihttiitrit ja ribad näitavad keskmisi log koopiasid millimeetri kohta standardhälbega.

Eluaadi stabiilsus

Märkus. Eluaadi stabiilsus oleneb suuresti erinevatest teguritest ja seostub spetsiifiliste järelrakendustega. See on kindlaks tehtud komplekti QIASymphony DSP Mini ja Midi Kit puhul koos järelrakenduste näidetega. Kasutaja kohustus on tutvuda kohaliku labori järelrakenduse kasutusjuhistega ja/või valideerida kogu töövoogu, et kindlaks teha vajalikud hoistamistingimused.

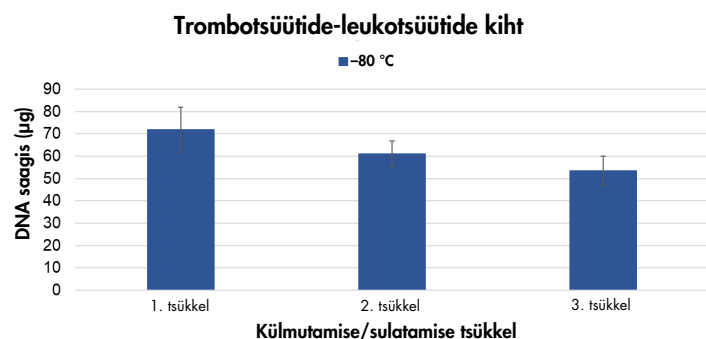
DNA veri ja trombotsüütide-leukotsüütide kiht

Eluaadi stabiilsust DNA vere rakenduses katsetati, kasutades eluaate QS-analüüsides, käitades DNA Blood 200 protokolliga eluaadimahuga 200 µl ja DNA Blood 1000 protokolliga eluaadimahuga 500 µl. Eluaate hoistati 2 ml Sarstedti katsutites toatemperatuuril, 2–8 °C, –20 °C ja –80 °C. DNA saagis ja puhtus määrati spektroskoopilise analüüsiga. DNA terviklikkust analüüsiti geeli elektroforeesi ja analüüsiga LongRange PCR (Joonis 9).



Joonis 9. Eluaadi stabiilsus DNA veres. DNA puhastati, kasutades protokolle DNA Blood 200 µl ja 1000 µl. Eluaadid on hoistatud 2 ml Sarstedti katsutites temperatuuril –80 °C. Analüüsiti nelja kordust. DNA terviklikkust testiti pikaajalise PCR-iga. Graafikul on näidatud 10-aastase hoistamise tulemused. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder.

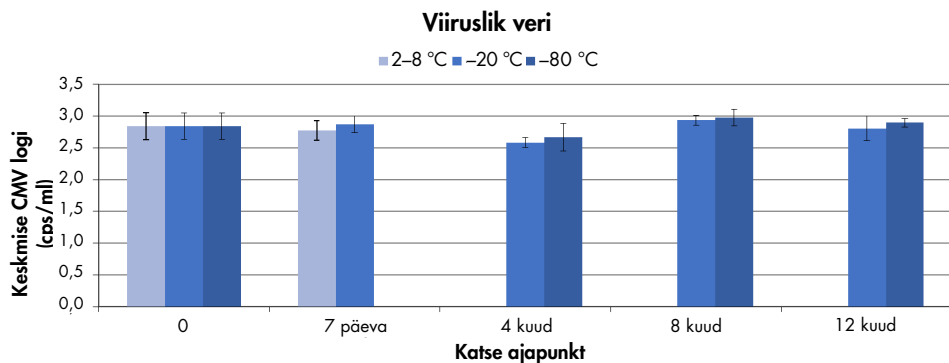
Eluaadi stabiilsust trombotsüütide-leukotsüütide kihi rakendamiseks katsetati, kasutades QS-analüüsi eluaate, mis sooritati protokolliga BC 400 µl ja eluaadimahuga 200 µl. Eluaate hoistati 2 ml Sarstedti katsutites ja statiividel Elution Micro Tube Rack toatemperatuuril, 2–8 °C, –20 °C ja –80 °C. Lisaks katsetati eluaate külmutamise/sulatamisega 3 tsükli jooksul (joonis 10). DNA saagis ja puhtus määrati kindlaks spektroskoopilise analüüsiga. DNA terviklikkust analüüsiti geeli elektroforeesi ja analüüsiga LongRange PCR (50 µl reaktsioon).



Joonis 10. Elueerige külmutamise/sulatamise tsükkel trombotsüütide-leukotsüütide kihi jaoks. DNA puhastati, kasutades protokolliga DNA BC 400 µl. Trombotsüütide-leukotsüütide kiht genereeriti EDTA-verest. Eluaadid on hoistatud 2 ml Sarstedti katsutites. DNA saagis määrati katse ajapunktides, kasutades sama 3 külmutuse/sulatuse tsükliga eluaati. DNA saagis määrati spektroskoopilise analüüsiga. Ribad näitavad absoluutset DNA saagist (keskmine väärtus standardhälbega).

Viiruslik veri

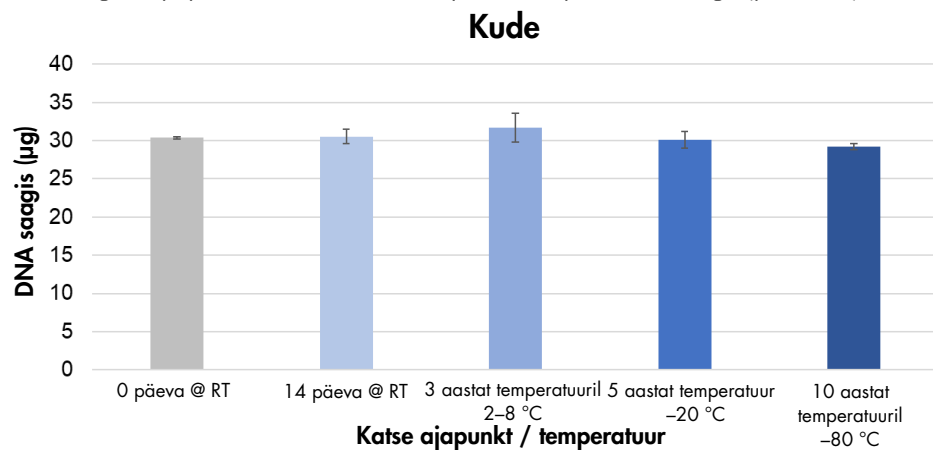
Eluaadi stabiilsust viirusliku vere rakenduses katsetati, kasutades eluaate QS-analüüsides, mis sooritati protokolliga Virus Blood 200 eluaadimahuga 60 µl. K₂ EDTA verele lisatud kaubanduslikult kättesaadavat CMV standardit (tiiter 2,7 log koopiat/ml) kasutati proovimaterjalina. Eluaate hoiustati 2 ml Sarstedti katsutites temperatuuril 2–8 °C, –20 °C ja –80 °C. Eluaate analüüsiti, kasutades CMV reaalaajas analüüsi (joonis 11). Järgnevalt on ära toodud mitme katse ajapunktid.



Joonis 11. Eluaadi stabiilsus viirusliku vere rakenduses. EDTA vereproovid, kuhu lisati kaubanduslikult kättesaadavat CMV standardit, puhastati protokolliga Virus Blood 200. Eluaate hoiustati erinevatel temperatuuridel statiividel Elution Micro tube rack ja 2 ml Sarstedti katsutites. Katses ajapunkti kohta analüüsiti 4 kordust. Riba näitab CMV tiitrit (keskmist logiväärtust koos standardhälbega).

Kude

Eluaadi stabiilsust koe rakenduse jaoks katsetati protokolliga Tissue HC 200 µl ja eluaadimahuga 200 µl. Proovimaterjalina kasutati värsket veisemaksa. Eluaate hoiustati 2 ml Sarstedti katsutites ja statiividel Elution Micro Tube Rack toatemperatuuril, 2–8 °C, –20 °C ja –80 °C. DNA saagised ja puhtus määrati kindlaks spektroskoopilise analüüsiga (joonis 12). DNA terviklikkust analüüsiti geeli elektroforeesiga.

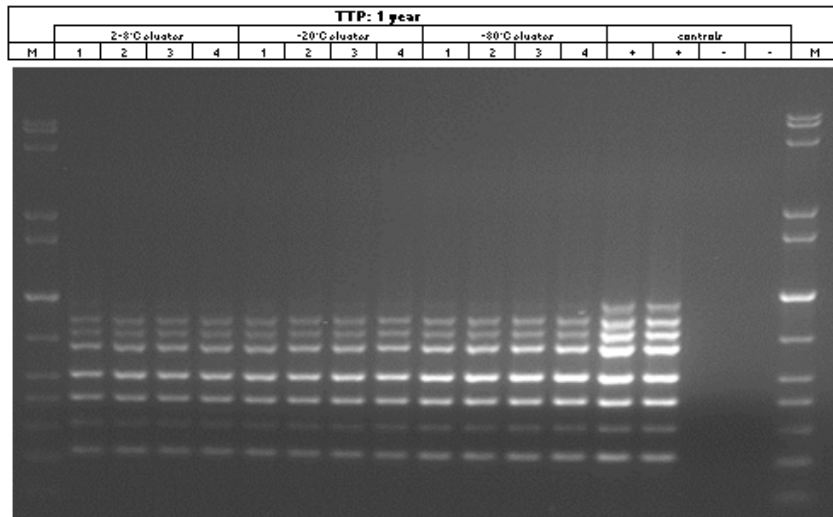


Joonis 12. Eluaadi stabiilsus koe jaoks. DNA puhastati kasutades protokolliga DNA Tissue HC elueerimismahuga 200 µl. Proovimaterjalina kasutati värsket veisemaksa. Eluaate hoiustati erinevatel temperatuuridel statiividel Elution Micro tube rack ja 2 ml Sarstedti katsutites. Katses ajapunkti kohta analüüsiti 4 kordust. DNA saagis määrati spektroskoopilise analüüsiga. Ribad näitavad absoluutset DNA saagist (keskmine väärtus standardhälbega).

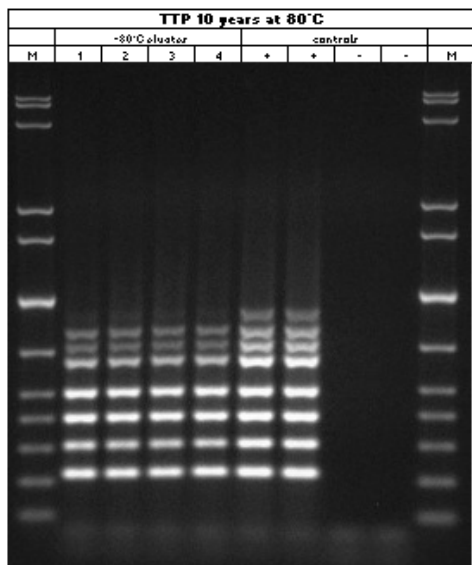
FFPE-kude

Eluaadi stabiilsus FFPE-koe rakenduse jaoks katsetati protokolliga Tissue LC 200 µl ja elueerimismahuga 100 µl. Proovimaterjalis kasutati kaubanduslikku inimese FFPE-kude. Eluaate hoiustati 2 ml Sarstedti katsutides ja statiividel Elution Micro Tube Rack toatemperatuuril, 2–8 °C, –20 °C, ja –80 °C. Eluaate analüüsiti majasisese inimese 8-plex PCR-analüüsiga (joonis 13). Järgnevalt on esitatud katse kaks ajapunkti.

A:



B:



Joonis 13. Eluaadi stabiilsus FFPE-koe jaoks. DNA puhastati kasutades protokolliga DNA Tissue LC. Proovimaterjalina kasutati kaubanduslikku FFPE-kude. Eluaate hoiustati erinevatel temperatuuridel statiividel Elution Micro tube rack ja 2 ml Sarstedti katsutites. Katse ajapunkti kohta analüüsiti 4 kordust. Eluaate analüüsiti majasisese inimese 8-plex PCR-analüüsiga.

Segavad ained

Inhibeerivate ainete, mis võivad täisveres sisalduda, mõju DNA vere rakendustele, viiruslikule verele, koe rakendusele kontrolliti järgmiste ainete lisamisega:

Tabel 8. Võimalikke segavaid aineid testiti erinevatel rakendustel

Segavad ained	Kontsentratsioon	Veri	Viiruslik veri	Kude
Bilirubiin	200 mg/l	√	√	√
Hemoglobiin	200 g/l	√	√	
Triglütseriidid	30 g/l	√	√	√
Valk	120 g/l	√	√	√

Märkus. „√“ näitab, millist proovimaterjali katsetati võimaliku segava aine suhtes.

Määrati kindlaks hemoglobiini (200 g/l) ja valgu (120 g/l) olemasolevad tasemed vereproovis ja lisati täiendavalt hemoglobiini või valku, et saavutada näidatud kontsentratsioonid, vastavalt 200 või 120 g/l. Bilirubiini (200 mg/l) ja triglütseriidide (30 g/l) kummagi aine üldkogus lisati proovidele, et saavutada näidatud kontsentratsioonid.

Koe puhul listi kummagi aine täiskogus lüsaatidele, kasutatud koeproovil ei määratud bilirubiini, triglütseriidi või valgu kontsentratsiooni.

Mis tahes segavad ained (nt ravimid) ja vastav kontsentratsioon on väga spetsiifiline järelrakenduse ja patsiendi võimaliku eelmise ravikuuri suhtes ning vajab uurimist järelrakenduse ajal, kasutades komplekte QIASymphony DSP DNA Mini ja Midi Kit.

Märkus. Katsetamiseks kasutati järelrakenduste näidiseid, et hinnata eraldatud nukleiinhapete kvaliteeti. Kuid erinevatel järelrakendustel võivad olla erinevad nõudmised puhtuse (s.t võimalike segavate ainete kontsentratsioon või nende puudmine) suhtes, seepärast on asjakohased ained ja vastavad kontsentratsioonid tuvastamiseks ja katsetamiseks vaja kindlaks määrata osana järelrakendusest, mida arendatakse mis tahes töövoos jaoks, mis hõlmab komplekte QIASymphony DSP Mini ja Midi Kit.

Märkus. Võtke arvesse, et komplekti QIASymphony DSP DNA Midi Kit arenduse ajal ei ilmnenud näidistusi hepariini negatiivse sooritusmõju kohta. Kuid standard ISO 20186-2:2019(E) ütleb, et verevõtukatsutis hepariin võib mõjutada isoleeritud nukleiinhapete ja puhtust ja võimalik jääkmõju eluaatidele võib põhjustada segamist mõnes järelrakenduses. Seepärast vastutab kasutaja hepariini negatiivse mõju valideerimise eest töövoole.

DNA veri ja trombotsüütide-leukotsüütide kiht

DNA vere rakenduste katsetamine tehti protokolliga DSP DNA 1000, mis hõlmab suurimat proovi sisendmahtu, kasutades elueerimismahte 200 ja 500 µl.

Eluaadid määrati kindlaks DNA saagise ja puhtuse spektroskoopilise analüüsiga. PCR-ühilduvust katsetati, kasutades analüüsi real-time PCR, samuti lõpp-punkti PCR-analüüsi.

Ükski tabelis 9 loetletud ainetest ei sega, kuid suure triglütseriidi kontsentratsiooniga vereproovides s (> 30 g/l) võib gDNA saagis olla madalam.

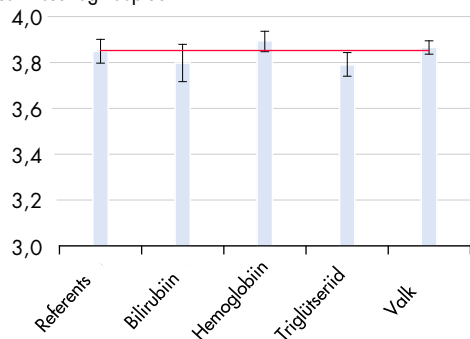
Viiruslik veri

Viiruse vere rakenduse jaoks tehti katsetus protokolliga DSP Virus Blood 200 ja elueerimismahuga 60 µl. CMV-negatiivsetele vereproovidele lisati 500 koopiat/ml (madal kontsentratsioon) ja 1×10^4 koopiat/ml (kõrge kontsentratsioon, joonis 14) kaubanduslikku CMV standardit.

Eluaate analüüsiti CMV analüüsiga real-time PCR.

Ükski tabelis 9 loetletud aine pole segav, kuid kõrge triglütseriidide kontsentratsiooniga (> 30 g/l) vereproovid võivad põhjustada viirusliku DNA väiksema puhtuse.

Keskised log koopiad



Joonis 14. Inhibeeriva aine test. Täisveri koguti 1 tervelt doonorilt katsutisse BD K2E ja sinna viidi CMV standardmaterjali (tiiter 4,0 log koopiat / ml). Viit proovi testiti võimalike inhibiitorite lisamisega ja DNA puhastati iga proovi 4 eksemplarist, kasutades komplekti QIASymphony DSP DNA Mini Kit ja viirusliku vere 200 DSP protokolliga elueerimismahuga 165 µl. Eluaate analüüsiti CMV-ga, kasutades analüüsi real-time PCR-i. Punane joon esindab etalonproovide, millele ei lisatud ühtegi inhibeerivat ainet, kindlaks määratud tiitrit, ja ribad näitavad keskmisi logi koopiaid milliliitri kohta standardhälbega.

Kude

DNA koe (värske ja külmutatud) testimiseks kasutati protokolliga DSP DNA HC elueerimismahuga 200 µl.

Eluaadid määrati kindlaks DNA saagise ja puhtuse spektroskoopilise analüüsiga. PCR-ühilduvuse testimiseks kasutati analüüsi real-time PCR.

Ühtki tabelis 9 loetletud ainetest ei tuvastatud negatiivse mõjuga proovi ettevalmistusele.

FFPE-kude

FFPE-koe testimiseks kasutati protokolliga DSP DNA LC elueerimismahuga 50 µl.

Ained (vt tabel 9) lisati lüsaadile otse.

Tabel 9. Võimalikke segavaid aineid testiti erinevatel rakendustel

Segavad ained	Kontsentratsioon lüsaadis
Ksüleen	Kuni 11%
Etanool	Kuni 11%
Deparaffinization Solution	Kuni 11%
Parafin	0,1 µM lõigud

Eluaadid määrati kindlaks DNA saagise ja puhtuse spektroskoopilise analüüsiga. PCR-ühilduvust katsetati, kasutades analüüsi real-time PCR, samuti majasisest inimese 8-plex PCR-analüüsi.

Ühtki tabelis 9 loetletud ainetest ei tuvastatud negatiivse mõjuga proovi ettevalmistusele.

Ristsaastumine





DNA veri

Ristsaastuse riski rakenduses QIASymphony DNA Blood analüüsiti, kätades neli korda 96 proovi seadmes QIASymphony SP erinevate partiidega (vahetades positiivseid ja negatiivseid proove), mida segasid täielikult negatiivsed partiid. Mudelsüsteemi jaoks kasutati mehe verd (sisaldades WBC arvu $\geq 1,0 \times 10^7$ rakku/ml) ja naise verd (sisaldades WBC arvu vahemikus $4,0 \times 10^6$ ja 9×10^6 rakku/ml). Proovi ettevalmistamiseks kasutati protokollis 1000 µl, mis hõlmas kõrgeimaid proovimahtusid. Negatiivsete naise proovide võimalikku saastumist eraldamise ajal hinnati järgneva eluaatide analüüsi käigus, kasutades Y-kromosoomi jaoks analüüsi real-time PCR.

Proovide, partiide või kätuste kaupa ülekanduvat ristsaastumist ei tuvastatud.

Sümbolid

Selles dokumendis kasutatakse järgmisi sümboleid. Vaadake kasutusjuhistes, pakendil või siltidel kasutatavate sümbolite täielikku loendit käsiraamatust.

Sümbol	Tähise selgitus
	See toode täidab Euroopa Liidu määruse 2017/746 <i>in vitro</i> diagnostikaks kasutatud meditsiiniseadmete kohta nõudeid.
	<i>In vitro</i> diagnostiline meditsiiniseade
	Katalooginumber
Rn	R on kasutusjuhendi läbivaatamine ja n on versiooninumber
	Tootja

Muudatuste ajalugu

Redaktsioon

R1, juuni 2022

Kirjeldus

Versioon 2, redaktsioon 1

- Uuendatud versioonile 2 vastamaks IVDR-ile
- Jaotised segavate ainete, ristsaastuse, eluaadi stabiilsuse ja järelrakendusega ühilduvuse kohta lisatud

Ajakohastatud teavet litsentsimise ja tootespetsiifiliste kohustustest loobumise kohta saate vastavast QIAGEN-i komplekti käsiraamatust või kasutusjuhendist. QIAGEN-i komplekti käsiraamatud ja kasutusjuhendid on saadaval veebilehel www.qiagen.com või tellimisel QIAGEN-i tehniliselt toelt või kohalikul müügiesindajalt.

Kaubamärgid: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, QIAamp®, EZ1®, UltraRun® (QIAGEN Group); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.). Selles dokumendis kasutatud registreeritud nimetused, kaubamärgid jne loetakse seadusega kaitstuks ka juhul, kui need pole eraldi kaubamärkidena tähistatud.

06/2022 HB-3029-D01-001 © 2022 QIAGEN. Kõik õigused kaitstud.

