



Kesäkuu 2022

QIASymphony® DSP Circulating DNA Kit -sarjan käyttöohje (suorituskykyominaisuudet)

Versio 2



In vitro -diagnostiikkaan

Käytettäväksi QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -sarjan kanssa



937556



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Saksa

R1

Suorituskykyominaisuudet ovat saatavilla sähköisesti tuotesivun Resource (Materiaalit) -välilehdessä osoitteessa www.qiagen.com.

Johdanto

QIASymphony DSP Circulating DNA -järjestelmä sisältää käyttövalmiin in vitro -järjestelmän kiertävän solunulkoisen DNA:n (circulating cell-free DNA, ccfDNA) kvalitatiiviseen puhdistamiseen ihmisen plasmasta ja virtsasta.

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

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -sarjassa on reagenssit täysin automaattiseen ja samanaikaiseen ccfDNA:n puhdistukseen monentyyppisestä ihmisen plasmasta (sekä plasmasta, jossa on ccfDNA-profiilin stabilointiaineita, kuten Streck®-yhtiön Cell-Free DNA BCT® -putkissa, että plasmasta, jossa ei ole ccfDNA-profiilin stabilointiaineita, kuten EDTA-putkissa) ja ihmisen virtsasta (ccfDNA-profiilin stabilointiaineilla tai ilman). Kaikkien verinäyteputkien suorituskykyominaisuuksia ei kuitenkaan ole määritetty, ja käyttäjän täytyy validoida ne.

Puhdistettu ccfDNA sopii monenlaisiin myöhempiin sovelluksiin, kuten PCR-kemiaan, fluoresenssipohjaisiin kvantifiointimäärittelykseen tai NGS-menetelmiin.

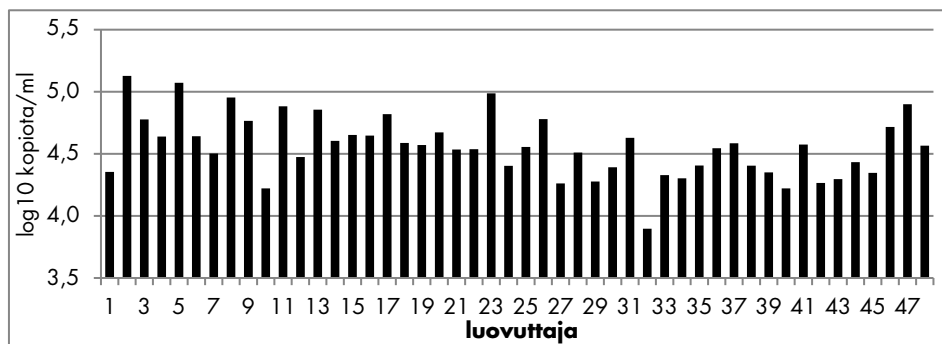
QIASymphony SP tekee kaikki puhdistuksen toimenpidevaiheet. Enintään 96 näytettä 24 näytteen erissä käsitellään yhdellä ajolla. Virtsanäytteet saattavat edellyttää manuaalista näytteiden esikäsittelyä.

Huomautus: Suorituskykyominaisuudet riippuvat useista tekijöistä ja liittyvät suunniteltuun myöhempään sovellukseen. QS DSP Circulating DNA Kit -sarjan stabiilius on määritetty esimerkkinä käytettyjen myöhempien sovellusten yhteydessä. Nukleiinihappojen biologisesta näytteestä eristämisen menetelmiä käytetään kuitenkin alkuvaiheena monissa myöhemmissä sovelluksissa, ja suorituskykyparametrit, kuten ristikontaminaatio ja ajon tarkkuus, on määritettävä tällaisille työnkuluille osana myöhempää sovellusta. Siksi koko työnkulun validoiminen suorituskykyparametrien saamiseksi on käyttäjän vastuulla.

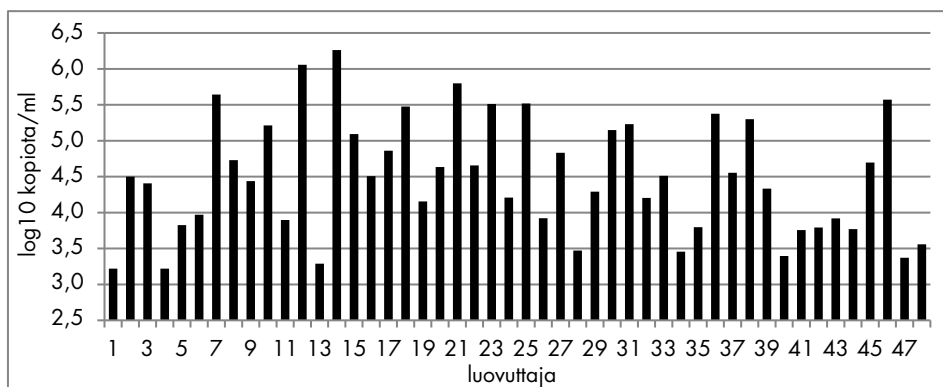
Perussuorituskyky

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -sarjan perussuorituskyky arvioitiin käyttämällä 48 yksittäisen luovuttajan näytteitä ccfDNA:n eristämiseen 4 ml:sta Streck-plasmaa sekä 4 ml:sta stabiloitua virtsaa. ccfDNA-tuotos määritettiin talonsisäisellä real-time PCR -määrityksellä 18S-ribosomaalisesta RNA:n koodaussekvenssistä.

Tuotosten ero (log₁₀ kopiota/ml) kuvassa 1 (4 ml plasmaa) ja kuvassa 2 (4 ml virtsaa) kuvastaa ccfDNA:n vahvasti luovuttajakohtaisia pitoisuuksia, jotka tyypillisesti havaitaan samasta näytemäärästä kutakin näytemateriaalia.



Kuva 1. ccfDNA-tuotos 48 yksittäisen luovuttajan plasmasta. Verinäytteet otettiin 48 yksittäiseltä luovuttajalta Cell-Free DNA BCT -putkiin (Streck). ccfDNA eristettiin 4 ml:n plasmanäytteistä QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -sarjalla. ccfDNA-tuotos kvantifioitiin talonsisäisellä real-time PCR -määrityksellä 18S-koodaussekvenssistä. Tulokset laskettiin kohdekopioina yhtä syötettyä plasmamillilitraa kohden.



Kuva 2. ccfDNA-tuotos 48 yksittäisen luovuttajan virtsasta. 48 yksittäiseltä luovuttajalta kerätty virtsa stabiloitiin Cell-Free DNA Urine Preserve® -aineella (Streck). ccfDNA eristettiin 4 ml:n virtsanäytteistä QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -sarjalla. ccfDNA-tuotos kvantifioitiin talonsisäisellä real-time PCR -määrityksellä 18S-koodaussekvenssistä. Tulokset laskettiin kohdekopioina yhtä syötettyä virtsamillilitraa kohden.

Ajon tarkkuus

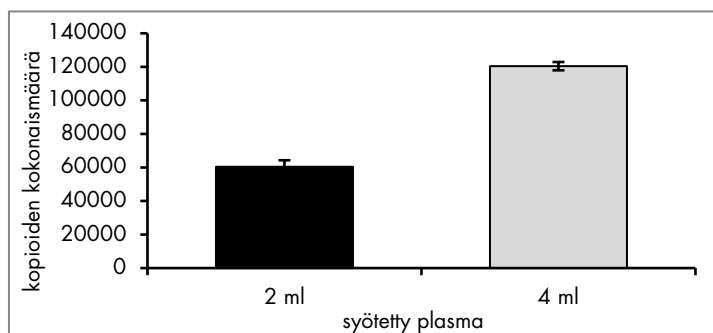
Variaatiokertoimet (Coefficient of Variation, CV) määritettiin ihmisen ccfDNA:n EDTA-plasmasta eristämistä varten. Tarkkuusanalyysia varten ccfDNA kvantifioitiin talonsisäisellä real-time PCR -määrityksellä 18S-ribosomaalisesta koodaussekvenssistä. QIASymphony-ajaja tehtiin yhteensä 10, kukin 4 erässä (8 replikaattia erä kohden). Tarkkuustiedot esitetään taulukossa 1.

Taulukko 1. Tarkkuusarvioiden analyysi

Tarkkuus	CV (%)
Erän sisällä	11,67
Toistettavuus	13,14
Osittainen tarkkuus	13,14
Kokonaistarkkuus	14,12

2 ja 4 ml:n protokollien yhtäläinen suorituskyky

2 ja 4 ml:n näytemäärän protokollien yhtäläinen suorituskyky arvioitiin QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -sarjalla käyttäen endogeenistä ccfDNA:ta, joka eristettiin ihmisen EDTA-plasmapoolista. Itsenäisiä QIASymphony-ajaja tehtiin yhteensä 8, kukin 4 erässä, 8 replikaattia erä kohden. QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -sarjan toimenpiteen lineaarinen alue on määritetty 18S-koodaussekvenssille talonsisäisellä real-time PCR -määrityksellä (kuva 3). 2 ja 4 ml:n protokollien eron suhde esitetään taulukossa 2 (vertailuprotokollassa käytetään 4 ml:n näytemäärää).



Kuva 3. Yhtäläinen suorituskyky 2 ja 4 ml:n näytemäärän protokollilla. ccfDNA-protokollan lineaarinen alue määritettiin 2 ja 4 ml:n protokollilla. ccfDNA-tuotos kvantifioitiin talonsisäisellä real-time PCR -määrityksellä 18S-koodaussekvenssistä. Tulokset laskettiin protokollakohtaisesti kopioiden kokonaismääränä.

Taulukko 2. Ero 2 ja 4 ml:n protokollien välillä (N = 256)

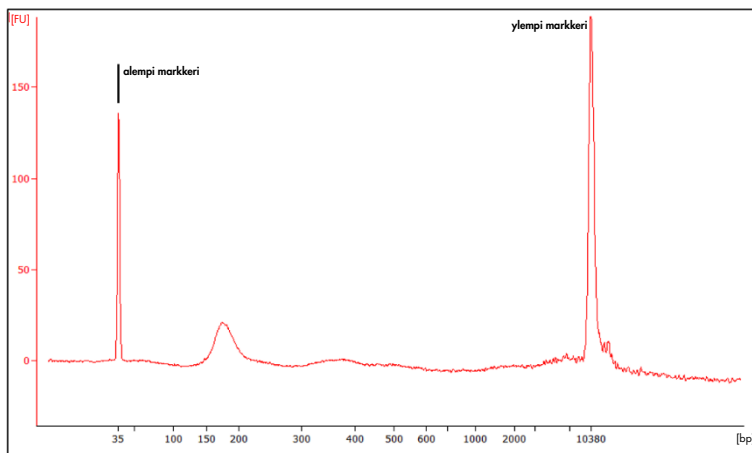
Parametri	Arvo
Geometrisen keskiarvon arvioitu suhde lasketussa pitoisuudessa (kopiota/ml)	1,01
Alempi 95 %:n luottamusraja	0,92
Ylempi 95 %:n luottamusraja	1,11
Kokonaistarkkuus	14,12

2 ja 4 ml:n näytemäärän protokollien suorituskyky on yhtäläinen mitattuna lasketujen kopioiden määrästä millilitraa kohden.

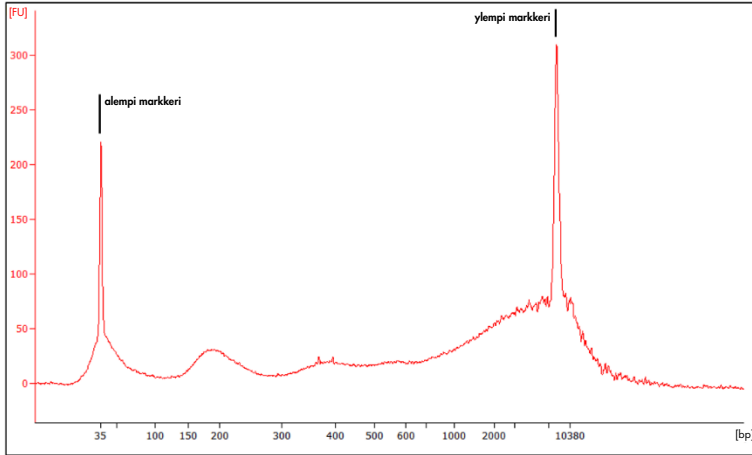
Kokojakauma

Näytteen ulostulon kokojakauma arvioitiin eristämällä ccfDNA 4 ml:sta syötettyä näytettä QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -sarjalla, eluoimalla se 75 µl:aan ja tekemällä sitten kokoanalyysi 1 µl:lle eluaattia Agilent® 2100 Bioanalyzer -laitteessa ja Agilent High Sensitivity DNA Chip -sirua käyttäen. Itsenäisiä replikaatteja tehtiin yhteensä viisi (5). Plasman edustava DNA-profiili esitetään kuvassa 4 ja virtsan kuvassa 5.

Kuvan 4 plasman elektroferogrammissa näkyy usein havaittu noin 165 bp:n huippu, joka vaihtelee välillä 145–196 bp, nukleosomissa histoniin liittyvän DNA:n pituusalueella. Kuvan 5 virtsan elektroferogrammista näkyy, että vallitseva, noin 160 bp:n huippu on leveämpi ja vaihtelee noin välillä 145–250 bp. Lisäksi virtsalla on havaittavissa toinen huippu noin 20–100 bp:n kohdalla (alemman markkerin huipun tasolla), mikä viittaa suuremman fragmentaation ccfDNA-fraktioon. Kuvassa 5 näkyy myös pitkien, yli 2 kb:n DNA-fragmenttien suuri määrä. Tällaisten genomisten DNA-fragmenttien runsautta havaitaan usein virtsanäytteissä todennäköisesti siksi, että genomista DNA:ta vapautuu virtsassa olevista soluista.



Kuva 4. Plasmasta erotetun ccfDNA:n kokojakauma (Bioanalyzer-profiili). ccfDNA eristettiin 4 ml:sta EDTA-plasmaa QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -sarjalla; 1 µl eluaattia testattiin Agilent High Sensitivity DNA Chip -analyysillä. x-akseli: emäsparin (Base Pair, bp) koko; y-akseli: fluoresenssiyksiköt (Fluorescence Unit, FU)

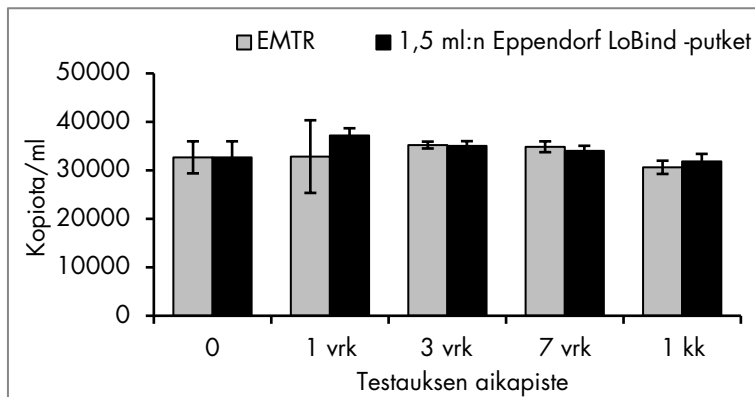


Kuva 5. Virtasta erotetun ccfDNA:n kokojakauma (Bioanalyzer-profiili). ccfDNA eristettiin 4 ml:sta virtsaa QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -sarjalla; 1 µl eluaattia testattiin Agilent High Sensitivity DNA Chip -analyysillä. x-akseli: emäsparin (Base Pair, bp) koko; y-akseli: fluoresenssiyksiköt (Fluorescence Unit, FU)

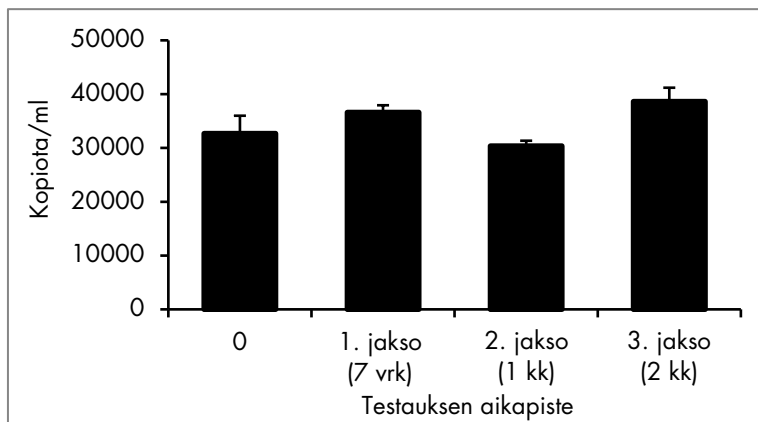
Eluaatin stabiilius

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -sarjan eluaatin stabiilius arvioitiin käyttämällä eristettyä ccfDNA:ta ihmisen EDTA-plasmapoolista. Eluaatteja säilytettiin kahdessa (2) eri eluutiolinemuodossa: QIAGEN® EMTR -putkissa (Elution Microtubes CL 96; tuotenro 19588) ja 1,5 ml:n Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock -putkissa. Eluaatit analysoitiin kahdeksana (8) replikaattina. DNA:n stabiilius eluaateissa määritettiin talonsisäisellä real-time PCR -määrityksellä 18S-ribosomaalisesta RNA:n koodaussekvenssistä.

Eluaatin stabiiliuteen 2–8 °C:ssa ei vaikuttanut säilytysjakson kesto aina yhteen kuukauteen saakka eikä säilytysmuoto (kuva 6). DNA:n stabiiliuteen LoBind-putkissa ei vaikuttanut säilytys –15...–30 °C:n lämpötilassa, kun tehtiin 3 pakastus-sulatusjaksoa 7 vuorokauden, yhden kuukauden ja kahden kuukauden jälkeen (kuva 7).



Kuva 6. ccfDNA:n stabiilius eluaateissa säilytettynä 2–8 °C:ssa 2 putkimuodossa. ccfDNA eristettiin EDTA-plasmapoolista QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -sarjalla ja säilytettiin 2–8 °C:ssa eri aikapisteisiin testausta varten. ccfDNA-tuotos kvantifioitiin talonsisäisellä real-time PCR -määrityksellä 18S-koodaussekvenssistä. Tulokset laskettiin kohdekopioina yhtä syötettyä plasmamillilitraa kohden.



Kuva 7. ccfDNA:n stabiilius eluaatteissa säilytettynä -15...-30 °C:ssa 3 pakastus-sulatusjaksolla. ccfDNA eristettiin EDTA-plasmasta QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -sarjalla ja säilytettiin -15...-30 °C:ssa 1,5 ml:n Eppendorf LoBind -putkissa. ccfDNA-tuotos määritettiin kolmessa (3) testauksen aikapisteessä käyttämällä samaa eluaattia kolmessa (3) pakastus-sulatusjaksossa. ccfDNA-tuotos kvantifioitiin talonsisäisellä real-time PCR -määrityksellä 18S-koodaussekvenssistä. Tulokset laskettiin kohdekopioina yhtä syötettyä plasmamillilitraa kohden.

Häiritsevät aineet

Ihmisen plasmaan ja virtsaan lisättiin mahdollisesti häiritseviä aineita (katso taulukko 3), jotta voitiin testata niiden vaikutus QS DSP Circulating DNA Kit -sarjan ccfDNA:n eristyksen suorituskykyyn ja myöhempään yhteensopivuuteen esimerkkeinä käytettyjen myöhempien määritysten kanssa. Eluaatit analysoitiin talonsisäisellä real-time PCR-määrityksellä 18S-koodaussekvenssistä ja Qubit® Fluorometer -fluoresenssimittarilla High Sensitivity dsDNA -määrityksen avulla.

Taulukko 3. Mahdollisten häiritsevien aineiden testipitoisuudet

Häiritsevät aineet	Plasma	Virtsa
Bilirubiini	200 mg/litra*	200 mg/litra*
Hemoglobiini	2 g/litra ¹	–
BSA ja gammaglobuliini	Korkeintaan 120 g/litra*	1 g/litra [†]
Triglyseridit	5 g/litra*	–
Glukoosi	10 g/litra*	10 g/litra*
Veri	–	1 % [†]
pH	–	pH 4 ja pH 9 [†]

* CLSI EP7-A2 Vol. 25 No. 27

[†] FDA-ohjeistusluonnos (11.5.2011)

Mikään taulukossa 3 luetelluista aineista ei ollut häiritsevä, lukuun ottamatta plasmanäytteitä, joissa on suuri gammaglobuliinipitoisuus (> 30 g/litra), sillä niiden kohdalla kiertävän solunulkoisen DNA:n talteenotto voi olla vähäisempää.

Huomautus: Testauksessa käytettiin esimerkkeinä käytettyjä myöhempiä sovelluksia eristettyjen nukleiinihappojen laadun arviointia varten. Myöhemmillä sovelluksilla voi kuitenkin olla eroavat puhdistusvaatimukset (mahdollisten häiritsevien aineiden osalta), joten olennaisten aineiden tunnistus ja testaus on määritettävä myös osana myöhempää sovellusta työnkuluissa, joissa käytetään QIASymphony DSP Circulating DNA Kit -sarjaa.

Ristikontaminaatio

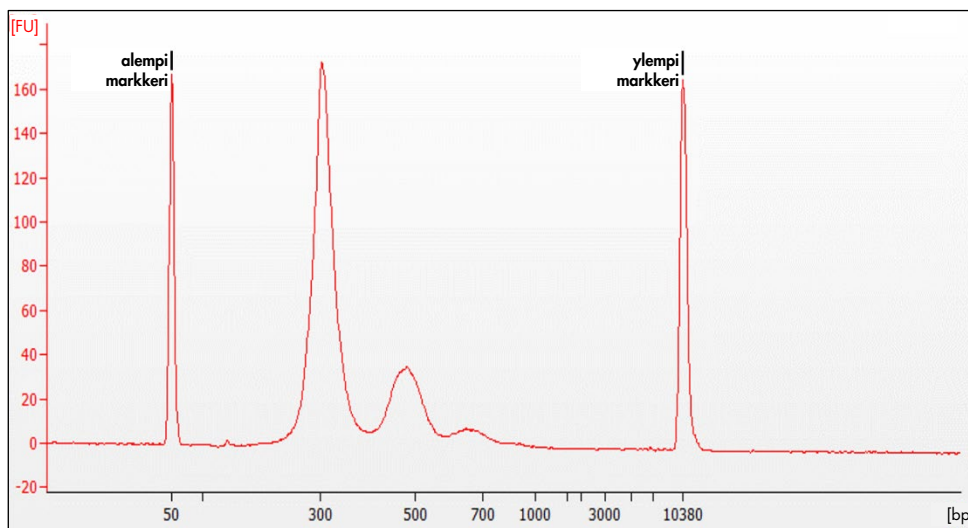
QIAasymphony DSP Circulating DNA -järjestelmän ristikonaminaation riski analysoitiin suorittamalla kolme 96 näytteen ajoa QIAasymphony SP -laitteella vuorottelevalla sakkilautakuviolla (positiiviset ja negatiiviset näytteet vuorottelevat). Mallijärjestelmän näytemateriaaleina käytettiin naisen plasmaa (negatiivinen näyte) ja naisen plasmaa, johon oli lisätty pilkottua miehen gDNA:ta pitoisuus $1,0E+05$ SRY1-geenin kopiota / millilitra plasmaa (positiivinen näyte). Näytteen valmistelussa käytettiin 4 ml:n protokollaa, jossa on kaksi erillistä 2 ml:n näytteen siirtoa. Negatiivisten naisen plasmanäytteiden mahdollinen kontaminaatio eristysajojen aikana arvioitiin seuraavalla eluaattien analyysillä, jossa käytettiin Y-kromosomille spesifisen SRY1-geenin real-time PCR -määrittystä.

Näytteiden välisestä, erien välisestä tai ajojen välisestä siirtymästä johtuvaa ristikonaminaatiota ei havaittu.

Yhteensopivuus erilaisten myöhempien sovellusten kanssa

QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit -sarjan kehityksessä käytettiin esimerkkeinä myöhempiä sovelluksia, joilla osoitettiin eristettyjen nukleinihappojen yhteensopivuus monenlaisten myöhempien sovellustekniikoiden kanssa, mukaan lukien real-time PCR (katso kuva 1, kuva 2, kuva 3, kuva 6 ja kuva 7), Qubit Fluorometer (proteiinimääritys ja suuren herkkyuden dsDNA-määritys), kirjasto (katso kuva 8) ja Next Generation Sequencing (NGS).


















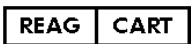
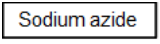
Kuvan 8 elektroferogrammi kuvaa esimerkkiä onnistuneesta adapteriligaatiosta ja myöhemmästä ccfDNA:n monistuksesta. Nukleosomaalisen ccfDNA:n vallitsevan 300 bp:n huipun (noin 165 plus noin 70 bp kullekin adapterille) vieressä näkyy myös dinukleosomaalinen huippu noin 470 bp:n kohdalla.



Kuva 8. QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit -sarjalla eristetty ccfDNA:n DNA-kirjasto (yksittäinen luovuttaja). ccfDNA eristettiin Streck-plasmasta 4 ml:n protokollalla, minkä jälkeen 35 µl:n eluaatti siirrettiin NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit -sarjaan (Biolabs). Monistuksen ja AMPure XP -puhdistuksen jälkeen 1 µl eluaattia analysoitiin Agilent 7500 DNA Kit -sarjalla.

Symbolit

Käyttöohjeessa tai pakkauksessa ja etiketeissä käytetään seuraavia symboleita:

Symboli	Selitys
	Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N> reaktioon
	Viimeinen käyttöpäivämäärä
	Tämä tuote täyttää in vitro -diagnostisia lääketieteellisiä laitteita koskevan eurooppalaisen säännöksen 2017/746 vaatimukset.
	In vitro -diagnostinen lääketieteellinen laite
	Tuotenumero
	Eränumero
	Materiaalinumero (ts. komponentin merkintä)
	Komponentit
	Sisältö
	Numero
	GTIN-numero
Rn	R tarkoittaa käyttöohjeiden versiota ja n on versionumero
	Lämpötilarajoitus
	Valmistaja
	Katso käyttöohjeet
	Varoitus/huomio
	Proteinaasi K
	Kuopan numero (ts. reagenssikasetin kuoppa)
	Reagenssikasetti
	Natriumatsidi

Symboli

Selitys

EtOH

Etanoli

UDI

Yksilöllinen laitetunniste

Muutoshistoria

Versio	Kuvaus
R1, heinäkuu 2022	Versio 2, revisio 1 <ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="619 395 1182 421">• Päivitys versioon 2 IVDR-vaatimusten täyttämiseksi<li data-bbox="619 442 1398 500">• Lisätty kohdat Häiritsevät aineet, Ristikontaminaatio ja Yhteensopivuus erilaisten myöhempien sovellusten kanssa

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®(QIAGEN Group); Cell-Free DNA Urine Preserve®, Cell-Free DNA BCT®, Streck® (Streck); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); Eppendorf®, LoBind® (Eppendorf AG); NEBNext® (New England Biolabs, Inc.); Qubit® (Thermo Fisher Scientific tai sen tytäryhtiö). Tässä asiakirjassa mainittuja rekisteröityjä nimiä, tavaramerkkejä jne. on pidettävä lain suojaamina, vaikkei niitä olisi erityisesti sellaisiksi merkitty.

HB-3034-D01-001 © 2022 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

Tämä sivu on jätetty tarkoituksella tyhjäksi.

