

# QIAamp® DSP Circulating NA Kit -tarvikesarjan käyttöohje (suorituskykyominaisuudet)

Versio 2



In vitro -diagnostiikkaan  
Käytettäväksi QIAamp DSP Circulating NA Kit -sarjan kanssa



61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Saksa

R1

Suorituskykyominaisuudet ovat saatavilla sähköisesti, ja ne voi ladata tuotesivun materiaalivälilehdestä osoitteessa [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Johdanto

QIAamp DSP Circulating NA Kit -tarvikesarja on järjestelmä, joka hyödyntää piidioksidikalvoteknologiaa (QIAamp-teknologia) kiertävän soluttoman (circulating cell-free, ccf) DNA:n ja RNA:n manuaaliseen eristämiseen ja puhdistamiseen ihmisen veriplasmanäytteistä.

Tuote on tarkoitettu ammattihenkilöiden, kuten molekyylibiologisen koulutuksen saaneiden teknikoiden ja lääkäreiden, käyttöön.

QIAamp DSP Circulating NA Kit -tarvikesarja on tarkoitettu in vitro -diagnostiikkaan.

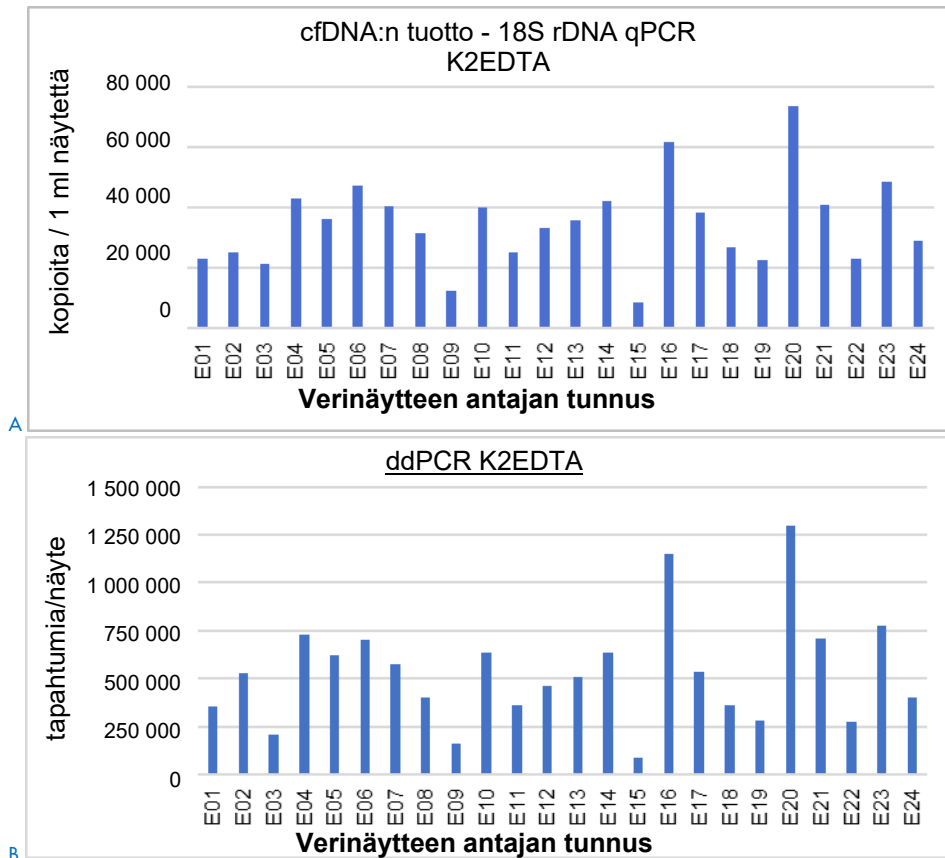
## Puhdistettujen nukleiinihappojen (Nucleic Acid, NA) tuotto

Plasmanäytteistä saatava puhdistettujen nukleiinihappojen tuotto voi vaihdella suuresti. Sen vuoksi käyttäjien kannattaa optimoida omassa laboratoriossaan plasman määrä ja eluutiotilavuus kyseessä olevan kohteen ja myöhemmän sovelluksen perusteella.

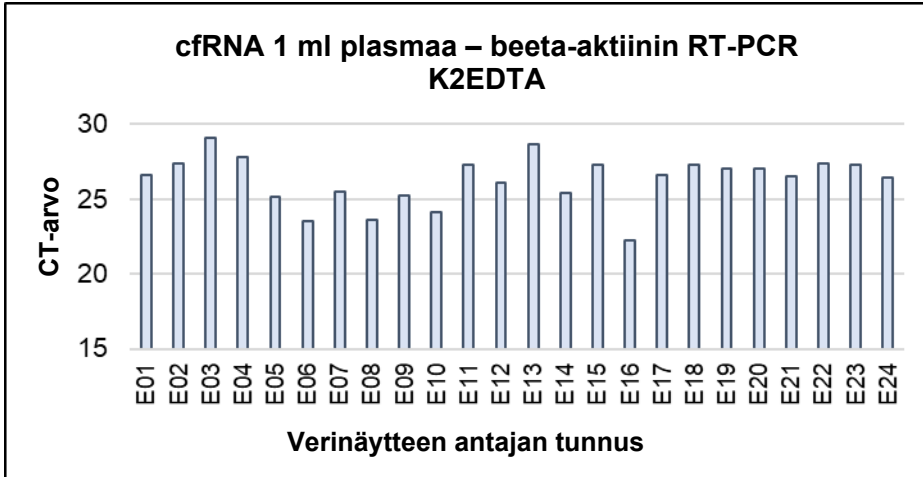
Jos sarjaa käytetään myöhemmin yhdessä QIAGEN®-sovellusten kanssa, katso ohjeita soveltuvan sovelluksen käsikirjasta.

# Analysointi myöhemmissä sovelluksissa

QIAamp DSP Circulating NA Kit -sarjalla eristetyt nukleiinihapot ovat valmiita käytettäväksi muissa myöhemmissä sovelluksissa. Sarjan suorituskyky arvioitiin eristämällä yhden ihmisen veriplasmanäytteistä nukleiinihapot käyttämällä kolmea eri verinäytteenottoputkea (BD Vacutainer® K2EDTA Tube, Becton Dickinson and Company; PAXgene® Blood ccfDNA Tube, PreAnalytiX GmbH ja Streck® Cell-Free DNA Blood Collection Tube (BCT)®, Streck; n = 24 luovuttajaa putkityyppiä kohden). 1 ml:n plasmanäytteen eluaatit testattiin RNA:n osalta käyttämällä kvantitatiivista PCR-testiä (quantitative PCR, qPCR, kuva 1A), digitaalista pisara-PCR-testiä (digital droplet PCR, ddPCR, kuva 1B) sekä käänteisen transkription qPCR-testiä (reverse transcription qPCR, RT-qPCR) (vain BD Vacutainer K2EDTA Tube plasma, kuva 2).



Kuva 1. Yhden luovuttajan plasmanäytteen (1 ml:n näyte) vertailu qPCR- ja ddPCR (Bio-Rad®) -testeillä



Kuva 2. Soluttoman RNA:n tunnistaminen yhden luovuttajan plasmasta (1 ml:n näyte) ihmisen beeta-aktiiniin RT-qPCR-määrityksellä (fragmentin pituus 293 emäsparia).

Seuraavan sukupolven sekvensointianalyysiä (Next-Generation Sequencing, NGS) varten 5 ml:n plasmanäyttemäärästä (BD Vacutainer K2EDTA Tube, PAXgene Blood ccfDNA Tube ja Streck Cell-Free DNA BCT;  $n = 8$  luovuttajaa putkityyppiä kohden) luotiin eluaatit. 5 ml:n plasmanäytteen DNA-kokonaistuotto vaihteli välillä 50–150 ng DNA:ta, ja tunnistamiseen käytettiin Qubit® HS dsDNA -määritystä. NGS-analyysi tehtiin käyttämällä GeneRead® QIAAct Actionable Insights Tumor Panel -paneelia ja GeneReader®-järjestelmää. Kaikki näytteet rikastettiin, ja niistä luotiin kirjastot. Lukutuloksista saatiin yhdistettyä ihmisen genomiin yli 98 %, ja > 99,8 %:lla mielenkiintoalueen sijainneista oli peruskattavuus  $\geq 500x$ .

Molempien nukleiinihappotyyppien (DNA ja RNA) osalta osoitettiin myöhempien sovellusten menestyksellä käyttö (kuva 3).

	qPCR	ddPCR	RT-qPCR	NGS
K2EDTA	✓	✓	✓	✓
PAXgene	✓	✓	ei testattu	✓
Streck	✓	✓	ei testattu	✓

Kuva 3. Eristettyjen nukleiinihappojen menestyksellä käyttö myöhemmissä eri sovelluksissa.

Käyttäjän on optimoitava plasmamäärä ja eluotiolavuus kohdemolekyylin ja hänen omassa laboratoriossaan mahdollisesti tehtävien seuraavien toimenpiteiden perusteella tai hänen on perehdyttävä kyseessä olevan myöhemmän sovelluksen tarkkoihin suorituskykytietoihin.

## Eluaatin vakaus

Eluaatin vakaus on riippuvainen eristettyjen nukleiinihappojen sisällöstä ja tyypistä, eluutiolavuudesta sekä säilytysolosuhteista. Suosittelemme, että käyttäjä määrittää omien tarpeidensa edellyttämän eluaatin vakauden.

Eluaatin vakaus testattiin DNA:n ja eluaattien osalta ihmisen plasmasta, jota oli säilytetty BD Vacutainer K2EDTA Tube -putkessa (Becton Dickinson and Company) tai stabiloivassa verinäytteenotto-putkessa (PAXgene Blood ccfDNA Tube ja Streck Cell-Free DNA BCT). Eluaatteja säilytettiin lämpötiloissa, jotka olivat  $-30\text{ °C} \dots -15\text{ °C}$  ja  $-90\text{ °C} \dots -65\text{ °C}$ . Minkäänlaista heikkenemistä ei huomattu 12 kuukauden ajanjakson aikana.  $2-8\text{ °C}$ :n lämpötilassa sekä huoneenlämmössä ( $15-25\text{ °C}$ ) säilytetyt eluaatit olivat vakaita 48 tuntiin asti. Kaikki olosuhteet arvioitiin käyttämällä qPCR-testiä, joka kohdistettiin ihmisen 18S rDNA -geeniin.

Eluaatin vakaus testattiin RNA:n osalta, ja eluaatit johdettiin ihmisen plasmasta, joka oli ollut BD Vacutainer K2EDTA Tubes -putkissa (Becton Dickinson and Company). Eluaatteja säilytettiin lämpötiloissa, jotka olivat  $-30\text{ °C} \dots -15\text{ °C}$  ja  $-90\text{ °C} \dots -65\text{ °C}$ . Minkäänlaista heikkenemistä ei huomattu 6 kuukauden ajanjakson aikana.  $2-8\text{ °C}$ :n lämpötilassa säilytetyt eluaatit olivat vakaita 48 tuntiin asti. Kaikki olosuhteet arvioitiin käyttämällä RT-qPCR-testiä, joka kohdistettiin ihmisen beeta-aktiinigeeniin.

Jos pakkauksia käytetään myöhemmin yhdessä QIAGEN-sovellusten kanssa, katso ohjeita soveltuvan pakkauksen käsikirjasta.

## Nukleiinihappojen eristämisen tarkkuus

Tarkkuus arvioitiin käyttämällä ihmisen plasmata, ja olosuhteet arvioitiin käyttämällä ihmisen 18S rDNA -geeniin kohdistettua qPCR-testiä.

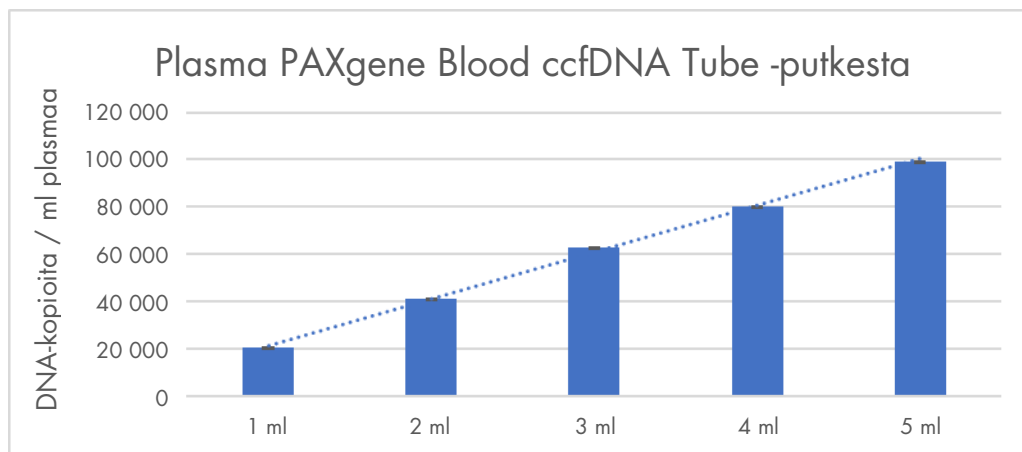
Koeasetelma käsitti 12 puhdistusajoa, joista kukin piti sisällään 12 toistoa (yhteensä 144 puhdistusta). Puhdistusajot suoritti kolme eri käyttäjää kolmena eri päivänä kolmella eri laitteella ja käyttäen kolmea eri erää QIAamp DSP Circulating NA Kit -sarjasta. QIAamp DSP Circulating NA Kit -sarjan kullekin yksittäiselle parametrille sekä kokonaisvaihtelulle (yhteensä) määritettiin keskihajonta (Standard Deviation, SD) ja variaatiokerroin (Coefficient of Variation, CV) (taulukko 1).

Taulukko 1. Tarkkuustulokset

Parametri	Tarkkuus		
	Keskimäärin kopioita/ml	SD	CV (%)
Ajojen välillä	25 894	461	1,78
Käyttäjien välillä		1392	5,38
Laitteiden välillä		228	0,88
Päivien välillä		2096	8,09
Erien välillä		969	3,74
Yhteensä		3120	12,05

## Lineaarisuus

Tiedot on tuotettu 1–5 ml:n plasmamäärästä verestä, jota on säilytetty BD Vacutainer K2EDTA Tube-, PAXgene Blood ccfDNA Tube- tai Streck Cell-Free DNA BCT -putkessa. Kaikkien verinäyteputkien osalta havaittiin DNA:n tuoton lineaarinen kasvu (katso kuva 4). Lisäksi BD Vacutainer K2EDTA Tube -putkien osalta sama havaittiin myös RNA:n suhteen.



**Kuva 4. DNA-kokonaistuoton lineaarinen kasvu (DNA:n kopiota / ml plasmanäytettä) eri plasmanäyttemäärillä.** Esitetyt PAXgene Blood ccfDNA Tube -putkesta otettua plasmaa koskevat tiedot vastaavat BD Vacutainer K2EDTA Tube- (DNA/RNA) ja Streck Cell-Free DNA BCT -putkissa säilytettyjen plasmanäytteiden tuloksia.

## Protokollien vastaavuus (Breeze- ja Classic-protokollat)

Suorituskyvyn vastaavuus Breeze- ja Classic-protokollissa määritettiin osoittamalla, että syklin kynnyсарvojen (Ct) keskiarvojen (RNA) tai kopioiden keskiarvoisten määrien millilitrassa (DNA) erotusten 95 %:n luottamusraja asetui kummassakin vaihtelualueelle  $\pm 2 \times$  keskihajonta (SD), kun SD oli Classic-protokollan havaittu tarkkuus (viiteolosuhde). Tähän käytettiin sarjasta kolme eri erää, ja kokeet suoritti kolme eri käyttäjää.

Breeze-protokollan osalta tuotettujen Ct-arvojen kokonaistarkkuus (SD) oli pienempi kuin Classic-protokollan kokonaistarkkuuden (SD) kaksipuolisen 95 %:n ennustevälin yläraja, kun ennusteväli laskettiin tutkimuksessa käyttämällä Classic-protokollasta saatuja tietoja ( $n = 143$ ) sekä käyttämällä tutkimuksen Breeze-protokollan tietopisteiden määrää ( $n = 144$ ).

## Häiritsevät aineet

Näytteeseen voi tulla häiritseviä aineita erilaisista lähteistä – ne voivat esimerkiksi olla luonnollisia metaboliitteja, päätyä näytteeseen potilaan hoidon aikana tai olla peräisin aineista, joita potilas on nauttinut. QIAamp DSP Circulating NA Kit -sarjan osalta testattiin endogeenisina komponentteina hemoglobiini, triglyseridit, EDTA, kofeiini, albumiini, konjugoitunut bilirubiini ja konjugoitumaton bilirubiini. Mitään häiriöitä ei havaittu käytettäessä qPCR-testiä myöhempänä sovelluksena. Lisäksi näytteen käsittelyn ja nukleiinihappojen eristämisen aikana ei havaittu myöskään häiriöitä, jotka olisivat johtuneet QIAamp DSP Circulating NA Kit -sarjan omista komponenteista (proteiinaasi K, puskuriaineet Buffer ACL, Buffer ACB, Buffer ACW1 ja Buffer ACW2 sekä etanoli).

Mahdollisten häiritsevien aineiden moninaisuuden ja tiettyjen myöhempien sovellusten erilaisten herkkyysien takia suosittelemme, että käyttäjä arvioi häiritsevien aineiden vaikutuksen oman työnkulkunsa perusteella ja validoi omat tarkkailumenetelmänsä myöhemmän diagnostisen sovelluksen häiriöiden varalta.

Lisätietoja häiritsevistä aineista tietyissä myöhemmissä QIAGEN-sovelluksissa saat vastaavien sarjojen käsikirjoista.

## Ristikontaminaatio

Ristikontaminaatiotason arvioimiseksi 5 ja 2 ml:n ihmisen veriplasmanäytteisiin lisättiin 105 kopiota HBV-virusta (positiiviset näytteet), ja niille tehtiin eristämistoimenpide virusta sisältämättömien näytteiden (negatiiviset näytteet) vieressä ruudukkomaisessa asetelmassa, jossa ajettiin vuorotellen eristämisajoja pelkille negatiivisille näytteille (eristyksen sisäisten sekä eristysten välisten ajojen ristikontaminaation arvioimiseksi). Tutkimuksessa pyrittiin jäljittämään tilannetta, jossa suuren määrän nukleiinihappokohdemolekyylejä sisältävät näytteet voivat ristikontaminoida muut näytteet eristystoimenpiteen aikana. Nukleiinihappojen puhdistus suoritettiin käyttämällä yhtä reagenssierää. Ristikontaminaatio arvioitiin käyttämällä *artus*<sup>®</sup> HBV RG CE PCR Kit -sarjaa. Tuloksissa ei näkynyt ristikontaminaatiota koko järjestelmässä.

# Symbolit



Tämä tuote täyttää in vitro -diagnostisia lääkitieteellisiä laitteita koskevan eurooppalaisen säännöksen 2017/746 vaatimukset.



In vitro -diagnostinen lääketieteellinen laite



Tuotenumero



Valmistaja

Rn

R tarkoittaa käyttöohjeen (suorituskykyominaisuudet) versiota, ja n on versionumero



# Asiakirjan muutoshistoria

Versio	Kuvaus
R1, heinäkuu 2022	QIAamp DSP Circulating Kit -sarjan version V2 IVDR-päivitys Lisätty käyttötarkoitukseen "manuaalinen" eristys. Ei muutoksia suorituskykytiedoissa verrattuna sarjan versioon 1.

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](http://www.qiagen.com), tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä palvelusta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Tavaramerkit: 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 tai sen tytäryhtiöt). Tässä asiakirjassa mainittuja rekisteröityjä nimiä, tavaramerkkejä jne. on pidettävä lain suojaamina, vaikkei niitä olisi erityisesti sellaisiksi merkitty.

06/2022 HB-3049-D01-001 © 2022 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

