

# Návod na použitie pre QIASymphony® DSP Circulating DNA Kit (charakteristiky účinnosti)

Verzia 2



Na diagnostické použitie in vitro

Na použitie so súpravou QIASymphony DSP Circulating DNA Kit



REF

937556



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Nemecko

R1

Charakteristiky účinnosti sú dostupné v elektronickej forme v záložke zdrojov na stránke výrobcu na adrese [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

## Všeobecný úvod

Systém QIASymphony DSP Circulating DNA sa skladá zo systému in vitro pripraveného na použitie na kvalitatívnu purifikáciu čistenie ľudskej cirkulujúcej bezbunkovej DNA (ccfDNA) z ľudskej plazmy a moču.

Súprav QIASymphony DSP Circulating DNA Kit je určená na použitie len v kombinácii s prístrojom QIASymphony SP.

Súprava QIASymphony DSP Circulating DNA Kit poskytuje reagenty na plne automatizovanú a simultánnu purifikáciu ccfDNA zo širokého spektra typov ľudskej plazmy (so stabilizátorom profilu ccfDNA (napr. Cell-Free DNA BCT® od spoločnosti Streck®, ako aj bez stabilizátorov profilu ccfDNA, napr. skúmavky EDTA) a ľudského moču (so stabilizátormi profilu ccfDNA aj bez nich). Charakteristiky účinnosti pre každú zbernú skúmavku na krv neboli stanovené a používateľ ich musí overiť.

Purifikovaná ccfDNA je kompatibilná so širokým spektrom následných aplikácií, napr. s chemickými látkami PCR, kvantifikačnými testami na báze fluorescencie alebo NGS.

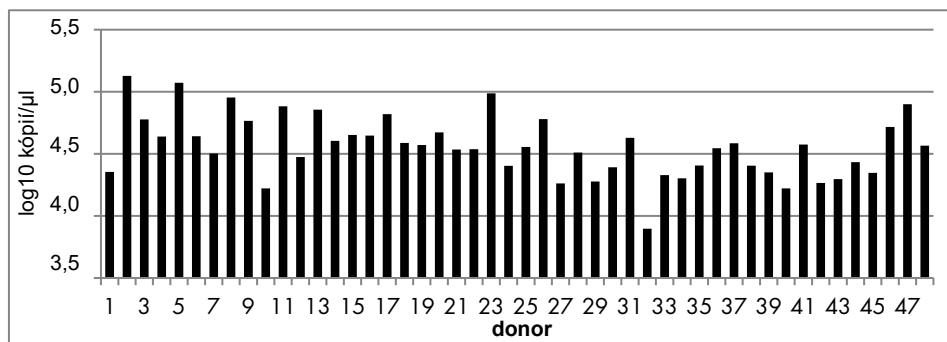
QIASymphony SP vykonáva všetky kroky procedúry čistenia. V jednom cykle sa spracuje až 96 vzoriek v dávkach po 24 kusov. Vzorky moču môžu vyžadovať manuálne predbežné ošetrenie vzorky.

Poznámka: Charakteristiky účinnosti väčšinou závisia od rôznych faktorov a súvisia s konkrétnou následnou aplikáciou. Boli stanovené pre súpravu QS DSP Circulating DNA Kit v spojení s príkladmi následných aplikácií. Metódy izolácie nukleových kyselín z biologických vzoriek sa však používajú ako front-end pre viaceré následné aplikácie, parameter účinnosti, napríklad krížová kontaminácia a presnosť cyklu, sa musí stanoviť pre každý takýto pracovný postup ako súčasť vývoja následnej aplikácie. Používateľ je preto zodpovedný za overenie celého pracovného postupu s cieľom stanoviť vhodné parametre účinnosti.

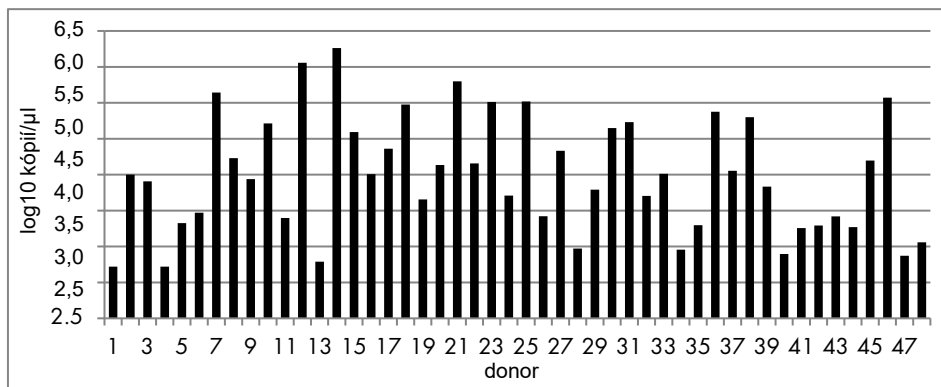
## Základná účinnosť

Základná účinnosť súpravy QIASymphony DSP Circulating DNA Kit sa hodnotila s použitím 48 samostatných donorov na extrakciu ccfDNA zo 4 ml plazmy Streck, ako aj zo 4 ml stabilizovaného moču. Výťažok ccfDNA sa stanovil pomocou interného real-time PCR testu pre kódujúcu sekvenciu 18S ribozomálnej RNA.

Rozdiel vo výťažkoch ( $\log_{10}$  kópií/ml) na obrázku 1 (4 ml plazmy) a obrázku 2 (4 ml moču) odráža koncentrácie ccfDNA silne závislé od donora, ktoré sa zvyčajne nachádzajú v rovnakom objeme príslušného materiálu vzorky.



**Obrázok 1. Výťažok ccfDNA z plazmy od 48 samostatných donorov.** Krv od 48 samostatných donorov bola odobratá v systéme Cell-Free DNA BCT (Streck). ccfDNA bola extrahovaná zo 4 ml plazmy pomocou súpravy QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. Výťažok ccfDNA sa kvantifikoval pomocou interného real-time PCR testu pre kódujúcu sekvenciu 18S. Výsledky sa vypočítali ako cieľové kópie na mililiter vstupného objemu plazmy.



**Obrázok 2. Výťažok ccfDNA z moču od 48 samostatných donorov.** Moč získaný od 48 samostatných darcov bol stabilizovaný pomocou Cell-Free DNA Urine Preserve® (Streck). ccfDNA bola extrahovaná zo 4 ml moču pomocou súpravy QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. Výťažok ccfDNA sa kvantifikoval pomocou interného real-time PCR testu pre kódujúcu sekvenciu 18S. Výsledky sa vypočítali ako cieľové kópie na mililiter vstupného objemu moču.

## Presnosť cyklu

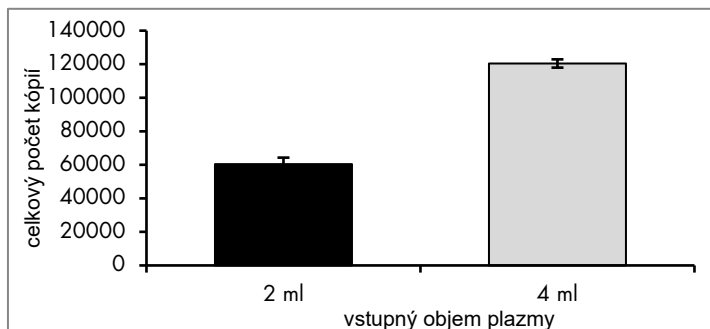
Pre extrakciu ľudskej ccfDNA z plazmy EDTA sa stanovili variačné koeficienty (CV). ccfDNA sa na účely analýzy presnosti kvantifikovala pomocou interného real-time PCR testu pre ribozomálnu kódujúcu sekvenciu 18S. Celkovo sa vykonalo 10 cyklov QIASymphony, každý v 4 dávkach (8 opakovaní na dávku). Údaje o presnosti sú zhrnuté v tabuľke 1.

**Tabuľka 1. Analýza odhadov presnosti**

Presnosť	CV (%)
V rámci dávky	11,67
Opakovateľnosť	13,14
Stredná presnosť	13,14
Celková presnosť	14,12

## Ekvivalentná účinnosť 2 ml a 4 ml protokolu

Ekvivalentná účinnosť protokolov pre 2 ml a 4 ml vstupného objemu vzorky sa hodnotila pre súpravu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit s použitím endogénnej ccfDNA extrahovanej z ľudskej plazmy EDTA. Celkovo sa vykonalo 8 cyklov QIASymphony, každý v 4 dávkach po 8 opakovaní na dávku. Pre kódujúcu sekvenciu 18S bol lineárny rozsah postupu so súpravou QIASymphony DSP Circulating DNA Kit stanovený pomocou interného real-time PCR testu (obrázok 3). Pomer rozdielu pre 2 ml a 4 ml protokol je uvedený v tabuľke 2 (referenčný protokol je 4 ml vstupného objemu vzorky).



**Obrázok 3. Ekvivalentná účinnosť pri použití protokolu s 2 ml a 4 ml vstupného objemu vzorky.** Lineárny rozsah protokolu ccfDNA bol stanovený pomocou 2 ml a 4 ml protokolu. Výťažok ccfDNA sa kvantifikoval pomocou interného real-time PCR testu pre kódujúcu sekvenciu 18S. Výsledky sa vypočítali ako celkový počet kópií na protokol.

Tabuľka 2. Rozdiel medzi 2 ml a 4 ml protokolom (N = 256)

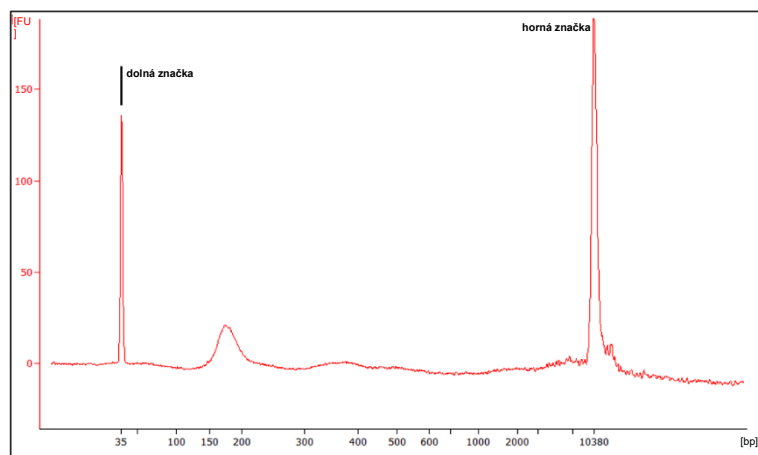
Parameter	Hodnota
Odhadovaný pomer geometrického priemeru vo vypočítaných kópiách/ml	1,01
Dolný 95 % limit spoľahlivosti	0,92
Horný 95 % limit spoľahlivosti	1,11
Celková presnosť	14,12

Účinnosť protokolov pre 2 ml a 4 ml vstupného objemu vzorky je ekvivalentná, meraná vo vypočítaných kópiách na mililiter.

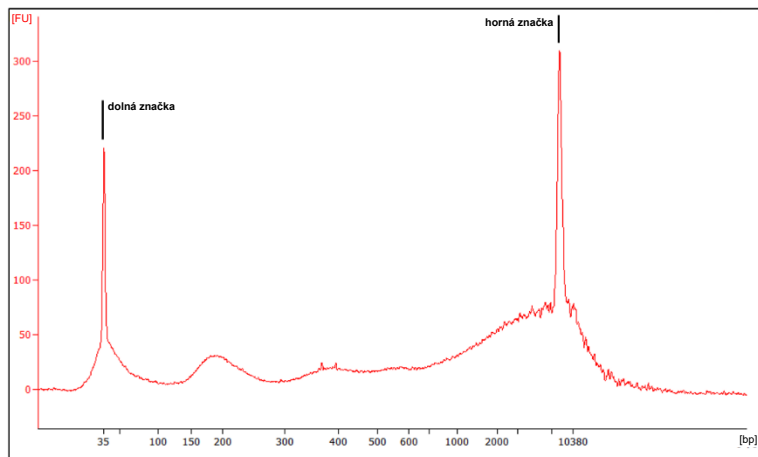
## Distribúcia veľkosti

Na vyhodnotenie distribúcie veľkosti výstupného objemu vzorky sa ccfDNA zo 4 ml vstupného objemu vzorky extrahovala pomocou súpravy QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit, eluovala sa v 75 µl a potom sa 1 µl eluátu podrobil analýze veľkosti pomocou bioanalyzátoru Agilent® 2100 s použitím čipu Agilent High Sensitivity DNA Chip. Celkovo sa vykonalo 5 nezávislých opakovaní. Jeden reprezentatívny profil DNA pre plazmu je zobrazený na obrázku 4 a pre moč na obrázku 5.

Na elektroferograme plazmy na obrázku 4 je vidieť často pozorované maximum s dĺžkou približne 165 bp, v rozmedzí od 145 do 196 bp, čo je v rozsahu dĺžky DNA viazanej na histón v nukleozóme. Na elektroferograme moču na obrázku 5 je vidieť, že prevládajúce maximum na úrovni približne 160 bp je širšie, s rozsahom približne 145 až 250 bp. Okrem toho je v prípade moču prítomné druhé maximum v rozsahu približne od 20 do 100 bp (na úrovni spodného maxima značky), ktorý naznačuje frakciu ccfDNA s vyšším stupňom fragmentácie. Okrem toho obrázok 5 znázorňuje vysoký počet dlhých fragmentov DNA približne od 2 kb. Vysoký výskyt takýchto fragmentov genómovej DNA sa často vyskytuje vo vzorke moču, čo je pravdepodobne spôsobené uvoľnením genómovej DNA z buniek prítomných v moči.



Obrázok 4. Distribúcia veľkosti ccfDNA z plazmy (profil Bioanalyzer). ccfDNA bola extrahovaná zo 4 ml EDTA plazmy pomocou súpravy QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit; 1 µl eluátu bol podrobený analýze na čipe Agilent High Sensitivity DNA Chip. Os x: veľkosť páru báz (bp); os y: fluorescenčné jednotky (FU).

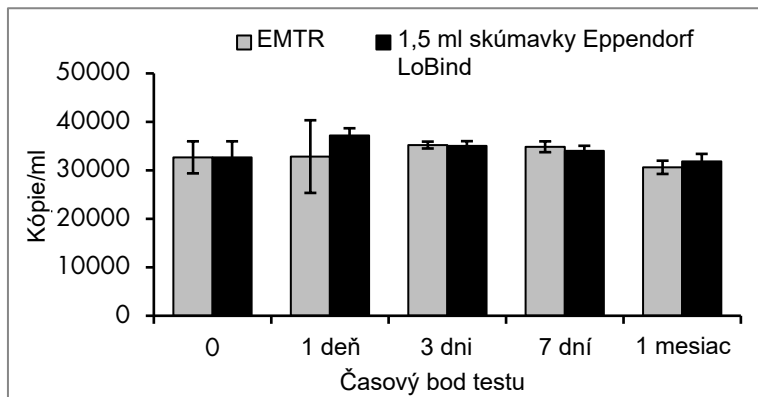


**Obrázok 5. Distribúcia veľkosti ccfDNA z moču (profil Bioanalyzer).** ccfDNA bola extrahovaná zo 4 ml moču pomocou súpravy QIASymphony DSP Circulating DNA Kit; 1  $\mu$ l eluátu bol podrobený analýze na čípe Agilent High Sensitivity DNA Chip. Os x: veľkosť páru báz (bp); os y: fluorescenčné jednotky (FU).

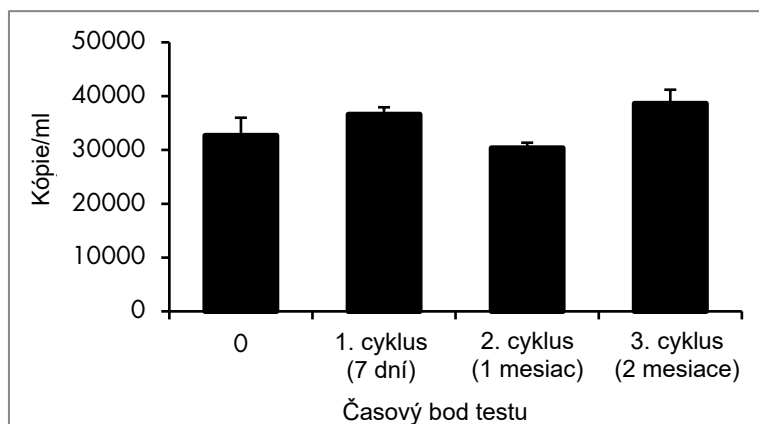
## Stabilita eluátu

Stabilita eluátu pre súpravu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit sa hodnotila pomocou ccfDNA extrahovanej z ľudskej plazmy EDTA. Eluáty sa skladovali v 2 rôznych formátoch elučného stojana: QIAGEN® EMTR (Elution Microtubes CL 96; kat. č. 19588) a 1,5 ml skúmavkách Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock. Eluáty sa analyzovali v 8 opakovaniach. Stabilita DNA v eluátoch sa stanovila pomocou interného real-time PCR testu pre kódujúcu sekvenciu 18S ribozomálnej RNA.

Stabilita výluhov pri teplote 2 – 8 °C nebola ovplyvnená dĺžkou skladovania až do jedného mesiaca ani formátom skladovania (obrázok 6). Stabilita DNA v skúmavkách LoBind nebola ovplyvnená skladovaním pri teplote – 15 °C až – 30 °C, ktoré zahŕňalo 3 cykly zmrazovania a rozmrazovania po 7 dňoch, jednom mesiaci a dvoch mesiacoch (obrázok 7).



**Obrázok 6. Stabilita ccfDNA v eluátoch skladovaných pri teplote 2 – 8 °C v 2 formátoch skúmaviek.** ccfDNA bola extrahovaná z plazmy EDTA pomocou súpravy QIASymphony DSP Circulating DNA Kit a uchovávaná pri teplote 2 – 8 °C pre rôzne časové body testu. Výťažok ccfDNA sa kvantifikoval pomocou interného real-time PCR testu pre kódujúcu sekvenciu 18S. Výsledky sa vypočítali ako cieľové kópie na mililitr vstupného objemu plazmy.



**Obrázok 7. Stabilita ccfDNA v eluátoch skladovaných pri teplote – 15 °C až – 30 °C vrátane 3 cyklov zmrazovania a rozmrazovania.** ccfDNA bola extrahovaná z plazmy EDTA pomocou súpravy QIASymphony DSP Circulating DNA Kit a skladovaná pri teplote – 15 °C až – 30 °C v 1,5 ml skúmavkách Eppendorf LoBind. Výťažok ccfDNA sa stanovil v 3 časových bodoch testu použitím toho istého eluátu pri 3 cykloch zmrazovania a rozmrazovania. Výťažok ccfDNA sa kvantifikoval pomocou interného real-time PCR testu pre kódujúcu sekvenciu 18S. Výsledky sa vypočítali ako cieľové kópie na mililiter vstupného objemu plazmy.

## Interferujúce látky

Do ľudskej plazmy a moču sa pridali rôzne potenciálne interferujúce látky (pozri tabuľku 3), aby sa otestoval ich vplyv na účinnosť extrakcie ccfDNA súpravou QS DSP Circulating DNA Kit a následná kompatibilita s príkladmi následných testov. Eluáty sa analyzovali pomocou interného real-time PCR testu v reálnom čase pre kódujúcu sekvenciu 18S a pomocou fluorometra Qubit® Fluorometer s použitím vysokocitlivého testu High Sensitivity dsDNA.

**Tabuľka 3. Testovacie koncentrácie potenciálnych interferujúcich látok**

Interferujúce látky	Plazma	Moč
Bilirubín	200 mg/liter*	200 mg/liter*
Hemoglobín	2 g/liter <sup>†</sup>	-
BSA a gamma-globulín	Max. 120 g/liter*	1 g/liter <sup>†</sup>
Triglyceridy	5 g/liter*	-
Glukóza	10 g/liter*	10 g/liter*
Krv	-	1 % <sup>†</sup>
pH	-	pH 4 a pH 9 <sup>†</sup>

\* \* CLSI EP7-A2 zv. 25 č. 27

<sup>†</sup> Návrh usmernenia FDA (11.5.2011)

Žiadna z látok uvedených v tabuľke 3 nie je interferujúca, okrem plazmových vzoriek s vysokými koncentraciami gama-globulínu (> 30 g/liter), ktoré môžu viesť k zníženiu obnovy cirkulujúcej bezbunkovej DNA.

Poznámka: Testovanie sa vykonalo pomocou príkladov následných aplikácií na posúdenie kvality extrahovaných nukleových kyselín. Rôzne následné aplikácie však môžu mať rôzne požiadavky na čistotu (t. j. neprítomnosť potenciálnych interferujúcich látok), takže identifikácia a testovanie príslušných látok sa musí stanoviť aj ako súčasť vývoja následných aplikácií pre akýkoľvek pracovný postup zahŕňajúci súpravu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit.

## Křížová kontaminácia

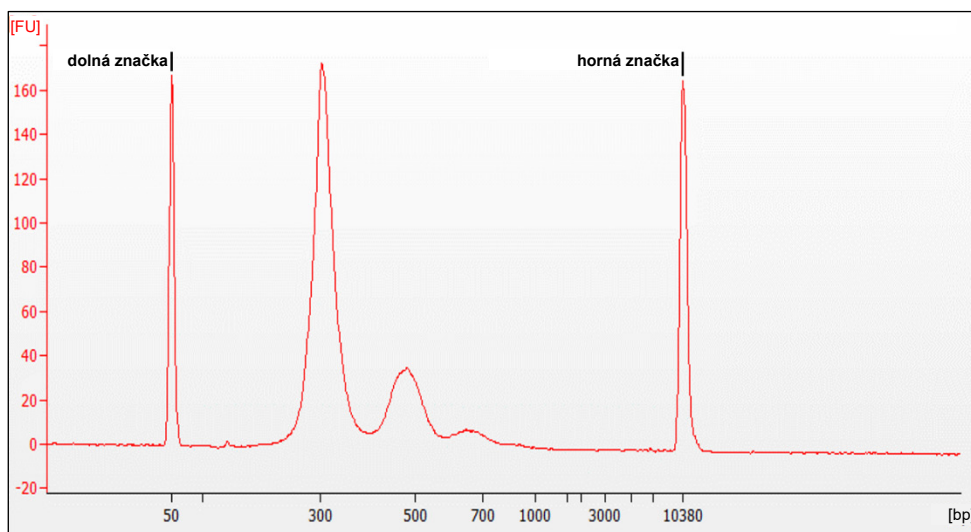
Riziko křížovej kontaminácie systému QIASymphony DSP Circulating DNA sa analyzovalo vykonaním troch sérií 96 vzoriek na prístroji QIASymphony SP so striedaním kontrolných dávok (striedanie pozitívnych a negatívnych vzoriek). Ako vzorkový materiál pre modelový systém sa použila ženská plazma (negatívna vzorka) a ženská plazma s prímiesou nastrihanej mužskej gDNA s koncentráciou 1,0E+05 kópií génu SRY1 na mililitr plazmy (pozitívna vzorka). Príprava vzoriek sa vykonala pomocou 4 ml protokolu, ktorý zahŕňa dva samostatné prenosy vzoriek, z ktorých má každá objem 2 ml. V prípade špecifického génu SRY1 chromozómu Y sa potenciálna kontaminácia negatívnych ženských plazmových vzoriek počas postupov extrakcie hodnotila následnou analýzou eluátov pomocou real-time PCR.

Nebola zistená žiadna křížová kontaminácia medzi vzorkami, medzi jednotlivými dávkami ani medzi jednotlivými sériami.

## Kompatibilita s rôznymi následnými aplikáciami

Počas vývoja súpravy QIASymphony DSP Circulating DNA Kit sa využili príklady následných aplikácií s cieľom dokázať, že izolované nukleové kyseliny sú kompatibilné so širokou škálou rôznych následných aplikačných technológií vrátane Real Time-PCR (pozri obrázok 1, obrázok 2, obrázok 3, obrázok 6 a obrázok 7), Qubit Fluorometer (proteínový test a vysoko citlivý test dsDNA), Library (pozri obrázok 8) a Next Generation Sequencing (NGS).


















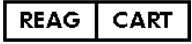
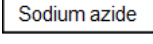
Elektroferogram na obrázku 8 znázorňuje príklad úspešnej ligácie adaptéra a následnej amplifikácie ccfDNA. Popri výraznom maxime pri 300 bp pre nukleozomálnu ccfDNA (približne 165 bp plus približne 70 bp pre každý adaptér) je viditeľný aj dinukleozomálne maximum pri približne 470 bp.



**Obrázok 8.** DNA knižnica ccfDNA (jeden donor) extrahovaná pomocou súpravy QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. ccfDNA sa extrahovala z plazmy Streck pomocou 4 ml protokolu a následne sa 35 µl eluátu prenieslo do súpravy NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit (Biolabs). Po amplifikácii a vyčistení AMPure XP sa 1 µl eluátu analyzoval pomocou súpravy Agilent 7500 DNA Kit.

## Symboly

Nasledujúce symboly nájdete v návode na použitie alebo na balení a štítkoch:

Symbol	Definícia symbolu
	Obsahuje reagenty postačujúce na <N> reakcií
	Použite do
	Tento výrobok spĺňa požiadavky európskeho nariadenia 2017/746 pre diagnostické zdravotnícke pomôcky in vitro.
	Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro
	Katalógové číslo
	Číslo šarže
	Číslo materiálu (t. j. označenie komponentu)
	Komponenty
	Obsahuje
	Číslo
	Identifikátor GTIN (Global Trade Item Number)
Rn	R označuje revíziu návodu na použitie a n je číslo revízie
	Teplotné obmedzenia
	Výrobca
	Prečítajte si návod na použitie
	Varovanie/upozornenie
	Proteináza K
	Číslo jamky (napr. jamka reagenčnej kazety)
	Reagenčná kazeta
	Azid sodný



**Symbol****Definícia symbolu****EtOH**

Etanol

**UDI**

Jedinečný identifikátor pomôcky

## História revízií

Revízia	Popis
R1, jún 2022	Verzia 2, revízia 1 <ul style="list-style-type: none"><li>Aktualizácia na verziu 2 pre súlad s nariadením o diagnostických zdravotníckych pomôckach in vitro</li><li>Pridaná časť Interferujúce látky, Krížová kontaminácia a Kompatibilita s následnými aplikáciami</li></ul>

Aktuálne licenčné informácie a právne informácie týkajúce sa výrobku nájdete v sprievodcovi alebo používateľskej príručke k súprave QIAGEN. Sprievodcov a používateľské príručky k súpravám QIAGEN nájdete na lokalite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) alebo o ne môžete požiadať oddelenie technických služieb spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

Ochranné známky: 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® (spoločnosť Thermo Fisher Scientific alebo jej dcérske spoločnosti). Registrované názvy, ochranné známky atď. použité v tomto dokumente sa nesmú považovať za známky nechránené podľa zákona, i keď neboli ako také označené príslušným symbolom.

HB-3034-D01-001 © 2022 QIAGEN, všetky práva vyhradené.

Táto strana je zámerne prázdna

