

QIAsymphony® DSP Circulating DNA Kit — Instrukcja użycia (Parametry skuteczności)

IVD

Do diagnostyki in vitro

Do użytku z

	Σ	REF	Wersja
QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit (192)	192	937556	V2
QIAsymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192)	192	937566	V1
QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit (96)	96	937555	V1



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NIEMCY

R2

Dokument Parametry skuteczności jest dostępny w wersji elektronicznej na karcie z materiałami źródłowymi na stronie produktu pod adresem www.qiagen.com.

Informacje ogólne

QIAasymphony DSP Circulating DNA to gotowy do użycia system in vitro przeznaczony do jakościowego oczyszczania wolnokrążącego DNA (circulating cell-free DNA, ccfDNA) z ludzkiego osocza i moczu.

Zestaw QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit jest przeznaczony wyłącznie do stosowania z aparatem QIAasymphony SP.

Zestaw QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit zawiera odczynniki umożliwiające wykonanie w pełni zautomatyzowanego jednoczesnego oczyszczania ccfDNA z próbek różnego rodzaju osocza ludzkiego (z dodatkiem stabilizatorów profilu ccfDNA, np. próbówki PAXgene® Blood ccfDNA Tube firmy PreAnalytiX; Cell-Free DNA BCT® firmy Streck®, jak również bez dodatku stabilizatorów profilu ccfDNA, np. próbówki z dodatkiem EDTA) oraz próbek ludzkiego moczu (z dodatkiem i bez dodatku stabilizatorów profilu ccfDNA). Nie ustalono jednak parametrów skuteczności dla wszystkich próbek do pobierania krwi, dlatego muszą one zostać zwalidowane przez użytkownika.

Oczyszczony ccfDNA można używać w szerokim zakresie dalszych procedur analitycznych, takich jak reakcje PCR, oznaczenia ilościowe oparte na fluorescencji oraz sekwencjonowanie NGS.

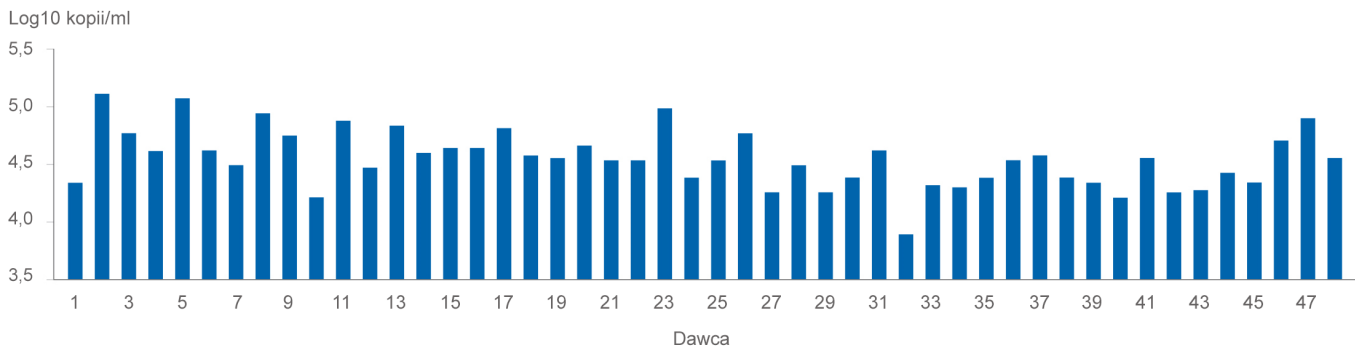
Aparat QIAasymphony SP wykonuje wszystkie etapy procedury oczyszczania. W ramach jednego cyklu można przetworzyć maksymalnie 96 próbek w partiach po 24 próbki. W przypadku próbek moczu może być wymagane ręczne wstępne przygotowanie próbek.

Uwaga: Parametry skuteczności w dużym stopniu zależą od różnych czynników i odnoszą się do konkretnej dalszej procedury analitycznej. Zostały ustalone dla zestawu QS DSP Circulating DNA Kit używanego w ramach standardowych dalszych procedur analitycznych. Pomimo że metody izolacji kwasów nukleinowych z próbek biologicznych stanowią etap początkowy dla wielu dalszych procedur analitycznych, parametry skuteczności, takie jak np. występowanie zanieczyszczenia krzyżowego lub precyzja testu, muszą zostać określone dla całego przepływu pracy (z uwzględnieniem wszystkich procedur) jako część procesu opracowywania konkretnej dalszej procedury analitycznej. Dlatego obowiązkiem użytkownika jest walidacja całej procedury w celu uzyskania odpowiednich parametrów skuteczności.

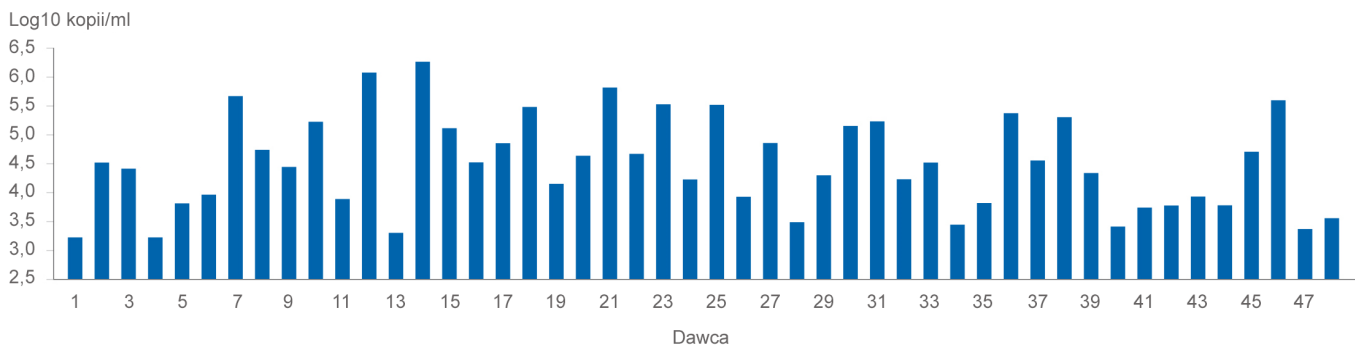
Skuteczność podstawowa

Podstawowa skuteczność zestawu QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit została oceniona przy użyciu ccfDNA wyizolowanego z próbek osocza o objętości 4 ml w próbkach firmy Streck oraz próbek stabilizowanego moczu o objętości 4 ml pobranych od 48 pojedynczych dawców. Uzysk ccfDNA został określony przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR ukierunkowanego na sekwencję kodującą cząsteczkę 18S rybosomalnego RNA.

Różnice w uzyskach (\log_{10} kopii/ml) przedstawione na Ryc. 1 (próbki osocza o objętości 4 ml) oraz na Ryc. 2 (próbki moczu o objętości 4 ml) odzwierciedlają silną zależność stężenia ccfDNA (wyizolowanego z odpowiednich próbek o tych samych objętościach) od konkretnego dawcy.

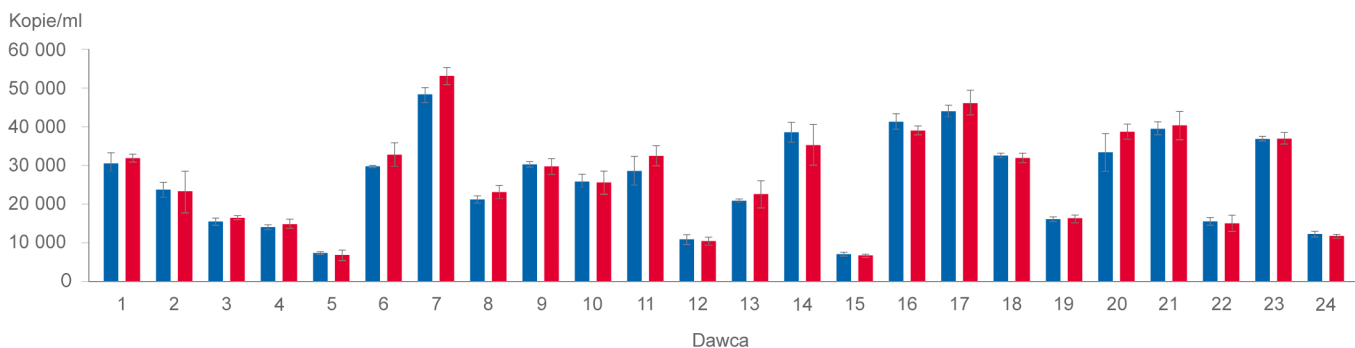


Ryc. 1. Uzysk ccfDNA z osocza pobranego od 48 pojedynczych dawców. Próbkki krwi od 48 pojedynczych dawców zostały pobrane do probówek Cell-Free DNA BCT (Streck). CcfDNA został wyizolowany z próbek osocza o objętości 4 ml przy użyciu zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. Uzysk ccfDNA został oznaczony ilościowo przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR ukierunkowanego na sekwencję kodującą cząsteczkę 18S. Wyniki zostały obliczone jako liczba kopii sekwencji docelowej na mililitr wejściowej próbki osocza.



Ryc. 2. Uzysk ccfDNA z moczu pobranego od 48 pojedynczych dawców. Próbkki moczu zebrane od 48 pojedynczych dawców zostały ustabilizowane przy użyciu środka Cell-Free DNA Urine Preserve® (Streck). CcfDNA został wyizolowany z próbek moczu o objętości 4 ml przy użyciu zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. Uzysk ccfDNA został oznaczony ilościowo przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR ukierunkowanego na sekwencję kodującą cząsteczkę 18S. Wyniki zostały obliczone jako liczba kopii sekwencji docelowej na mililitr wejściowej próbki moczu.

Ponadto oceniono skuteczność podstawową zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit w porównaniu z metodą ręcznej izolacji ccfDNA, zestawem QIAamp DSP Circulating NA Kit, nr kat. 61504. W tym celu uzyskano osocze z probówek PAXgene® Blood ccfDNA Tube (CE-IVD) od 24 pojedynczych dawców w celu izolacji ccfDNA z objętości 4 ml, a ccfDNA uzyskane z obu zestawów do izolacji ccfDNA eluowano w 75 µl. Uzysk ccfDNA został określony przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR ukierunkowanego na sekwencję kodującą cząsteczkę 18S rybosomalnego RNA. Różnice w uzyskach (kopie/ml) przedstawione na Ryc. 3 odzwierciedlają silną zależność stężenia ccfDNA zwykle obecnego w osoczu od konkretnego dawcy.



● QIASymphony DSP Circulating DNA Kit ● QIAamp DSP Circulating NA Kit

Ryc. 3. Równoważność skuteczności izolacji ccfDNA za pomocą zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit w porównaniu z zestawem QIAamp DSP Circulating NA Kit. Osocze pobrane od 24 pojedynczych dawców stabilizowano za pomocą probówki PAXgene Blood ccfDNA Tube. CcfDNA został wyizolowany z próbek osocza o objętości 4 ml przy użyciu zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit i zestawu QIAamp DSP Circulating NA Kit. Uzysk ccfDNA został oznaczony ilościowo przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR ukierunkowanego na sekwencję kodującą cząsteczkę 18S. Wyniki zostały obliczone jako liczba kopii sekwencji docelowej na mililitr wejściowej próbki osocza.

Skuteczność zautomatyzowanego i ręcznego zestawu do izolacji ccfDNA jest równorzędna. Pomiarów dokonywano przy użyciu wartości wyrażonych jako liczba kopii na mililitr. Stosunek średniej geometrycznej dla zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit i zestawu QIAamp DSP Circulating NA Kit przedstawiono w Tabeli 1 (zestawem referencyjnym jest zestaw QIASymphony DSP Circulating DNA Kit).

Tabela 1. Stosunek średniej geometrycznej zestawu QIAamp DSP Circulating NA Kit / zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (N = 213)

Parametr	Wartość
Szacowany stosunek średnich geometrycznych stężeń (obliczonych jako kopie/ml)	1,074
Dolna granica 95-procentowego przedziału ufności	1,048
Górna granica 95-procentowego przedziału ufności	1,100

Precyzja testu

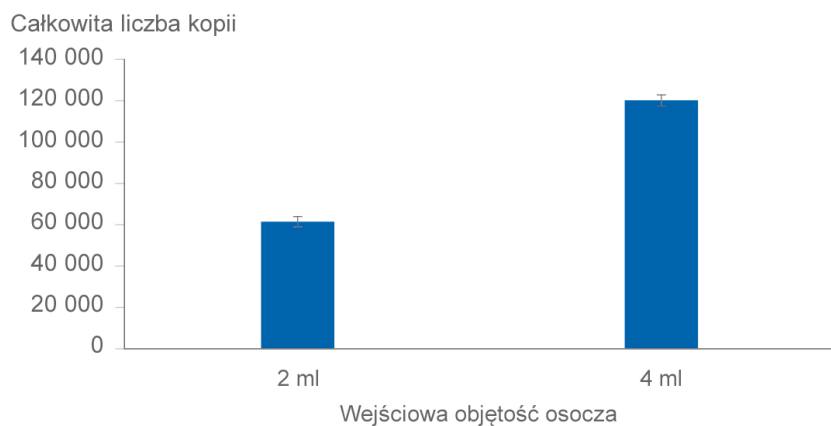
Współczynniki zmienności (coefficient of variation, CV) zostały określone dla ccfDNA wyizolowanego z ludzkich próbek osocza z dodatkiem EDTA. Na potrzeby analizy precyzji uzysk ccfDNA został oznaczony ilościowo przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR ukierunkowanego na sekwencję kodującą cząsteczkę 18S. Łącznie przeprowadzono 10 testów przy użyciu produktu QIASymphony. W każdym teście wykorzystano 4 partie próbek (każda partia składała się z 8 powtórzeń). Dane dotyczące precyzji przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Analiza oszacowań wartości precyzji

Precyzja	CV (%)
W ramach partii	11,67
Powtarzalność	13,14
Precyzja pośrednia	13,14
Precyzja całkowita	14,12

Równorzędna skuteczność protokołów dla próbek o objętości 2 ml i 4 ml

Równorzędna skuteczność protokołów izolacji przy użyciu zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit dla próbek o objętościach wejściowych wynoszących 2 ml i 4 ml została oceniona przy użyciu endogennego ccfDNA wyizolowanego z próbki zbiorczej ludzkiego osocza z dodatkiem EDTA. Łącznie przeprowadzono 8 testów przy użyciu produktu QIASymphony. W każdym teście wykorzystano 4 partie próbek (każda partia składała się z 8 powtórzeń). Zakres liniowy wartości uzyskanych w procedurze zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit został określony dla sekwencji kodującej cząsteczkę 18S przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR (Ryc. 4). Stosunek różnicy wartości uzyskanych w protokołach wykorzystujących próbki o objętości 2 ml i 4 ml przedstawiono w Tabeli 3 (jako protokół referencyjny przyjęto protokół wykorzystujący próbki o objętości wejściowej wynoszącej 4 ml).



Ryc. 4. Równorzędna skuteczność podczas wykonywania protokołów dla próbek o objętościach wejściowych wynoszących 2 ml i 4 ml. Zakres liniowy wartości uzyskanych podczas wykonywania protokołu izolacji ccfDNA został określony na podstawie wyników uzyskanych dla protokołów wykorzystujących próbki o objętościach wynoszących 2 ml i 4 ml. Uzysk ccfDNA został oznaczony ilościowo przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR ukierunkowanego na sekwencję kodującą cząsteczkę 18S. Wyniki zostały obliczone jako całkowita liczba kopii na protokół.

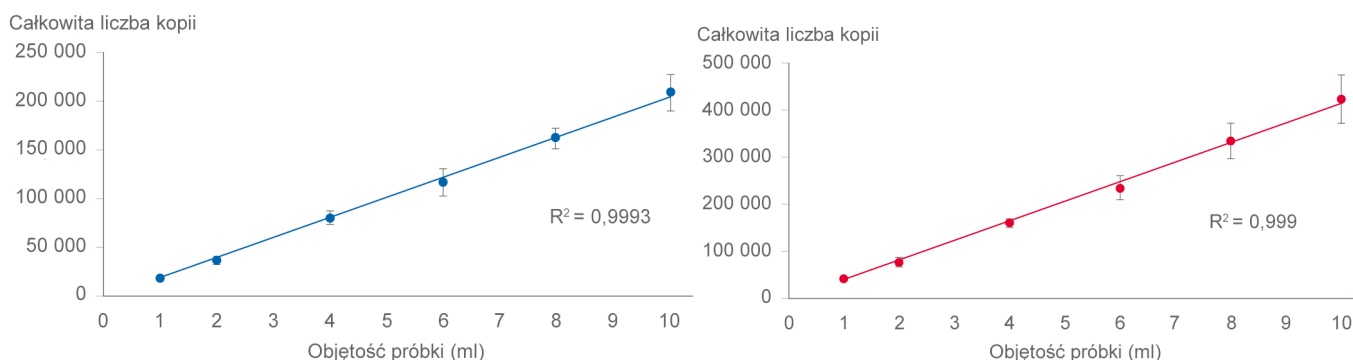
Tabela 3. Różnica między protokołem dla próbek o objętości 2 ml a protokołem dla próbek o objętości 4 ml (N = 256)

Parametr	Wartość
Szacowany stosunek średnich geometrycznych stężeń (obliczonych jako kopie/ml)	1,01
Dolna granica 95-procentowego przedziału ufności	0,92
Górna granica 95-procentowego przedziału ufności	1,11
Precyzja całkowita	14,12

Skuteczność protokołów dla próbek o objętościach wejściowych wynoszących 2 ml i 4 ml jest równorzędna. Pomiarów dokonywano przy użyciu wartości wyrażonych jako liczba kopii na mililitr.

Liniowa skuteczność izolacji ccfDNA w zakresie objętości próbki 1–10 ml

Równorzędna skuteczność protokołów izolacji przy użyciu zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit dla próbek o objętościach wejściowych wynoszących 1–10 ml została oceniona przy użyciu endogennego ccfDNA wyizolowanego z próbki zbiorczej ludzkiego osocza i moczu. Osocze uzyskano z probówki Streck Cell-Free DNA BCT®, a mocz stabilizowano za pomocą środka konserwującego Streck® Urine Preservative. Stabilizowane osocze i mocz od co najmniej 10 dawców połączono i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu użycia. CcfDNA został wyizolowany z próbek o objętości 1, 2, 4, 6, 8 i 10 ml przy użyciu zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit w połączeniu z protokołami circDNA dla próbek o objętości od 1 ml do 10 ml. Dla każdej objętości wejściowej przeprowadzono 12 powtórzeń izolacji. Zakres liniowy wartości uzyskanych w procedurze zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit został określony dla sekwencji kodującej cząsteczkę 18S przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR (Ryc. 5).



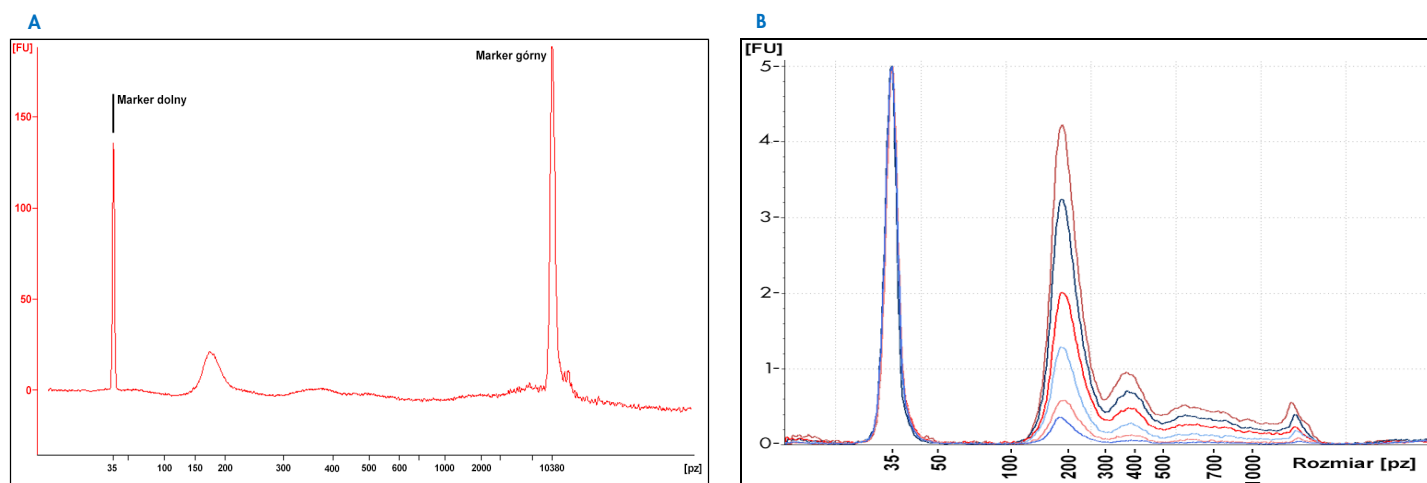
Ryc. 5. Liniowa skuteczność izolacji ccfDNA w zakresie objętości próbki 1–10 ml. Zakres liniowy wartości uzyskanych podczas wykonywania protokołu izolacji ccfDNA został określony na podstawie wyników uzyskanych dla protokołów wykorzystujących próbki o objętościach wynoszących 1, 2, 4, 6, 8 i 10 ml. CcfDNA izolowano ze stabilizowanego osocza (rycina po lewej stronie, niebieskie kropki) i stabilizowanego moczu (rycina po prawej stronie, czerwone kropki). Uzysk ccfDNA został oznaczony ilościowo przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR ukierunkowanego na sekwencję kodującą cząsteczkę 18S. Wyniki zostały obliczone jako całkowita liczba kopii na protokół.

Rozkład wielkości

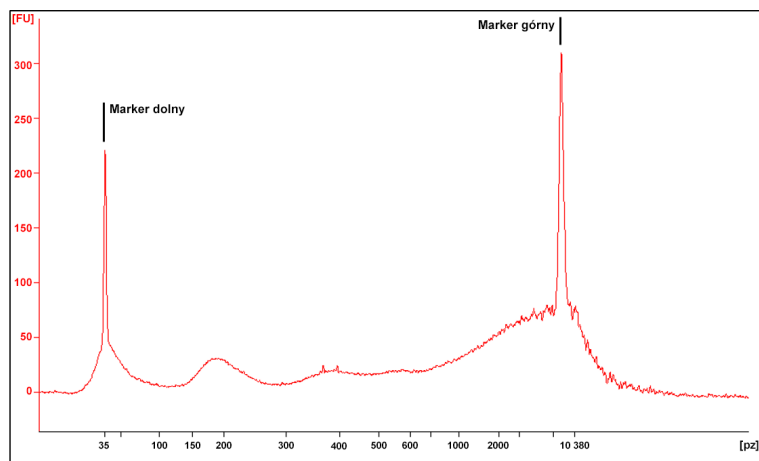
W celu oceny rozkładu wielkości próbki wyjściowej z próbki wejściowej o objętości 4 ml przy użyciu zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit wyizolowano materiał ccfDNA, a następnie 75 µl tego materiału poddano elucji. 1 µl uzyskanego eluatu poddano analizie wielkości przy użyciu aparatu Agilent® 2100 Bioanalyzer oraz mikromacierzy Agilent High Sensitivity DNA Chip. Łącznie wykonano 5 niezależnych powtórzeń. Na Ryc. 6A i Ryc. 7 przedstawiono po jednym reprezentatywnym profilu DNA uzyskanym odpowiednio dla osocza oraz moczu.

Elektroforegram osocza widoczny na Ryc. 6A przedstawia często obserwowany pik występujący przy około 165 pz, w zakresie od 145 do 196 pz, który mieści się w zakresie długości DNA wiążącego histony w nukleosomie. Elektroforegram moczu widoczny na Ryc. 7 wskazuje, że dominujący pik występujący przy około 160 pz jest szerszy i mieści się w zakresie od 145 do 250 pz. Ponadto w przypadku moczu w zakresie od 20 do 100 pz (na poziomie pików dolnego markera) występuje drugi pik wskazujący na obecność frakcji ccfDNA o wyższym stopniu fragmentacji. Ryc. 7 przedstawia również dużą liczbę długich fragmentów DNA o długości od około 2 kpz. Duża ilość fragmentów genomowego DNA tego typu jest często stwierdzana w próbkach moczu, najprawdopodobniej ze względu na uwalnianie genomowego DNA z komórek obecnych w moczu.

Oprócz pików przy około 165 pz dla DNA związanego z histonami (mononukleosom) izolacja ccfDNA z próbek o dużych objętościach ujawniła dodatkowo pik dla wielonukleosomów przy około 350 pz i >500 pz (Ryc. 6B)). W tym celu przy użyciu zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit wyizolowano ccfDNA z osocza o objętości 1–10 ml uzyskanego z probówki PAXgene Blood ccfDNA Tube, a następnie 75 µl tego materiału poddano elucji. 1 µl uzyskanego eluatu poddano analizie wielkości przy użyciu produktu Agilent® Cell-free DNA Screen Tape.



Ryc. 6. Rozkład wielkości ccfDNA obecnego w osoczu (profil uzyskany przy użyciu aparatu Bioanalyzer). (A) CcfDNA został wyizolowany z próbki osocza z dodatkiem EDTA o objętości 4 ml przy użyciu zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit; 1 µl eluatu został poddany analizie przy użyciu mikromacierzy Agilent High Sensitivity DNA Chip. Oś x — wielkość w parach zasad (pz); oś y — jednostki fluorescencji (fluorescence unit, FU). (B) CcfDNA został wyizolowany z próbki osocza o objętości 1 ml, 2 ml, 4 ml, 6 ml, 8 ml i 10 ml uzyskanego z probówek PAXgene® Blood ccfDNA Tube przy użyciu zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit; 1 µl eluatu został poddany analizie przy użyciu produktu Agilent Cell-free DNA Screen Tape. Sześć profili wielkości w różnych kolorach ilustruje wzrost czułości wykrywania rozkładu wielkości ccfDNA w zależności od objętości wejściowej osocza w zakresie 1–10 ml użytego do izolacji. Oś x — wielkość w parach zasad (pz); oś y — jednostki fluorescencji (fluorescence unit, FU), pik przy 35 pz — marker dolny.

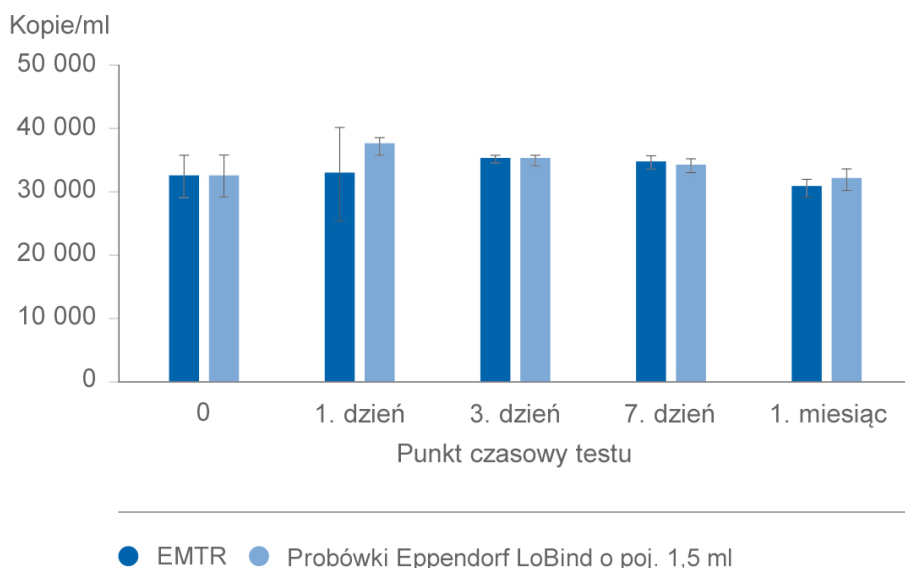


Ryc. 7. Rozkład wielkości ccfDNA obecnego w moczu (profil uzyskany przy użyciu aparatu Bioanalyzer). CcfDNA został wyizolowany z próbki moczu o objętości 4 ml przy użyciu zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit; 1 µl eluatu został poddany analizie przy użyciu mikromacierzy Agilent High Sensitivity DNA Chip. Oś x — wielkość w parach zasad (pz); oś y — jednostki fluorescencji (fluorescence unit, FU).

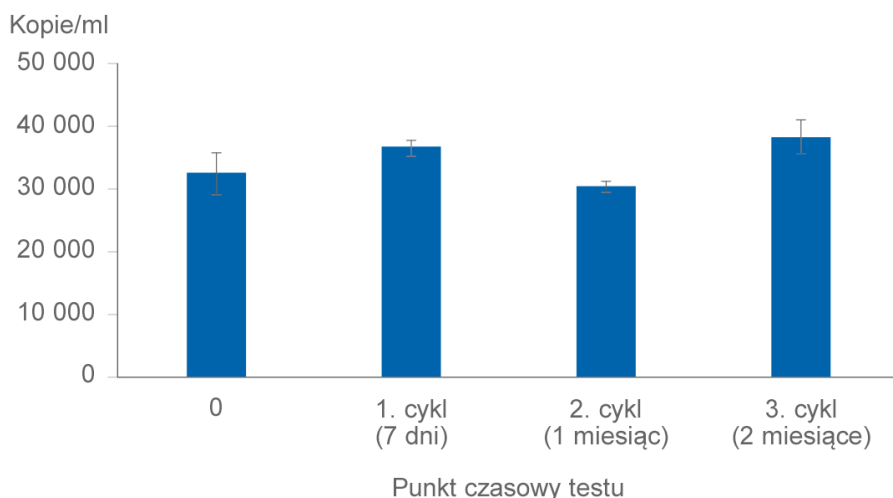
Stabilność eluatu

Stabilność eluatu dla zestawu QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit została oceniona przy użyciu ccfDNA wyizolowanego z ludzkiej zbiorczej próbki osocza z dodatkiem EDTA. Eluaty były przechowywane w statywach elucji, w probówkach o 2 różnych formatach: probówkach QIAGEN® EMTR (Elution Microtubes CL 96; nr kat. 19588) oraz Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock o pojemności 1,5 ml. Eluaty analizowano w powtórzeniach po 8. Stabilność DNA w eluatach została określona przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR ukierunkowanego na sekwencję kodującą cząsteczkę 18S rybosomalnego RNA.

Na stabilność eluatu przechowywanego w temperaturze 2–8°C nie miał wpływu czas przechowywania wynoszący do jednego miesiąca ani format probówki, w której był przechowywany (Ryc. 8). Na stabilność DNA w probówkach LoBind nie miało wpływu przechowywanie w temperaturze od -15°C do -30°C, które obejmowało 3 cykle zamrażania-rozmrażania wykonane po 7 dniach, jednym miesiącem oraz dwóch miesiącach przechowywania (Ryc. 9).



Ryc. 8. Stabilność ccfDNA w eluatach przechowywanych w temperaturze 2–8°C w 2 formatach probówek. CcfDNA został wyizolowany z osocza z dodatkiem EDTA przy użyciu zestawu QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit, a następnie był przechowywany w temperaturze 2–8°C przez różny czas (zastosowano różne punkty czasowe testu). Uzysk ccfDNA został oznaczony ilościowo przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR ukierunkowanego na sekwencję kodującą cząsteczkę 18S. Wyniki zostały obliczone jako liczba kopii sekwencji docelowej na mililitr wejściowej próbki osocza.



Ryc. 9. Stabilność ccfDNA w eluatach przechowywanych w temperaturze od -15°C do -30°C, z uwzględnieniem 3 cykli zamrażania-rozmrażania. CcfDNA został wyizolowany z osocza z dodatkiem EDTA przy użyciu zestawu QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit, a następnie był przechowywany w temperaturze od -15°C do -30°C w probówkach Eppendorf LoBind o pojemności 1,5 ml. Uzysk ccfDNA został określony względem 3 punktów czasowych testu oraz 3 cykli zamrażania-rozmrażania, przy użyciu tego samego eluatu. Uzysk ccfDNA został oznaczony ilościowo przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR ukierunkowanego na sekwencję kodującą cząsteczkę 18S. Wyniki zostały obliczone jako liczba kopii sekwencji docelowej na mililitr wejściowej próbki osocza.

Substancje zakłócające

Do próbek ludzkiego osocza i moczu dodano różne potencjalne substancje zakłócające (patrz Tabela 4) w celu zbadania ich wpływu na skuteczność izolacji ccfDNA przy użyciu zestawu QS DSP Circulating DNA Kit oraz na zgodność z wykonywanymi następnie standardowymi dalszymi procedurami analitycznymi. Eluaty analizowano przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR ukierunkowanego na sekwencję kodującą cząsteczkę 18S oraz metodą fluorometrii w aparacie Qubit® Fluorometer przy użyciu wysoko czułego oznaczenia dsDNA.

Tabela 4. Stężenia wykorzystywane w badaniu wpływu potencjalnych substancji zakłócających

Substancje zakłócające	Osocze	Mocz
Bilirubina	200 mg/litr*	200 mg/litr*
Hemoglobina	2 g/litr ¹	-
BSA i gamma-globulina	do 120 g/litr*	1 g/litr [†]
Trójglicerydy	5 g/litr*	-
Glukoza	10 g/litr*	10 g/litr*
Krew	-	1% [†]
pH	-	pH 4 i pH 9 [†]

* CLSI EP7-A2 Vol. 25 No. 27

[†] FDA Draft Guidance (Wersja robocza wytycznych FDA) (11.05.2011 r.)

Nie stwierdzono, aby jakakolwiek substancja wymieniona w Tabeli 4 wykazywała wpływ zakłócający. Wyjątek stanowiły próbki osocza o wysokim stężeniu gamma-globuliny (>30 g/litr), które może spowodować obniżenie odzysku wolnokrążącego DNA.

Uwaga: W celu oceny jakości wyizolowanych kwasów nukleinowych przeprowadzono testy przy użyciu przykładowych procedur. Różne dalsze procedury analityczne mogą jednak być odmienne pod względem wymagań dotyczących czystości materiału (tj. braku potencjalnych substancji zakłócających), dlatego sposób identyfikacji i badania różnych substancji zakłócających musi również zostać ustalony jako część procesu opracowywania konkretnych dalszych procedur analitycznych dla jakiegokolwiek przebiegu pracy uwzględniającego użycie zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit.

Zanieczyszczenie krzyżowe

Ryzyko zanieczyszczenia krzyżowego systemu QIASymphony DSP Circulation DNA analizowano dla protokołów analizy próbek o objętości 1 ml, 4 ml i 10 ml, które obejmują oddzielne etapy przenoszenia próbek (jeden, dwa i pięć) o objętości 1 ml lub 2 ml. Wykonano trzy testy przy użyciu 96 próbek (1 ml i 4 ml) i sześć testów przy użyciu 48 próbek (10 ml) w aparacie QIASymphony SP. Próbkami o różnym statusie były testowane w ramach jednej partii, w której układano je w układzie szachownicy (naprzemiennie ułożone próbki pozytywne i negatywne). W przypadku protokołu dla próbek o objętości 1 ml i 4 ml jako materiały do modelu wykorzystano osocze żeńskie (próbka negatywna) i osocze żeńskie wzbogacone pociętym męskim gDNA o stężeniu 1,0E+05 kopii genu SRY1 na mililitr osocza (próbka pozytywna). W przypadku protokołu dla próbek o objętości 10 ml jako materiały do modelu wykorzystano osocze (próbka negatywna) i osocze wzbogacone fragmentem DNA o długości 1000 pz z genu GFP o stężeniu 1,0E+05 kopii na mililitr osocza (próbka pozytywna).

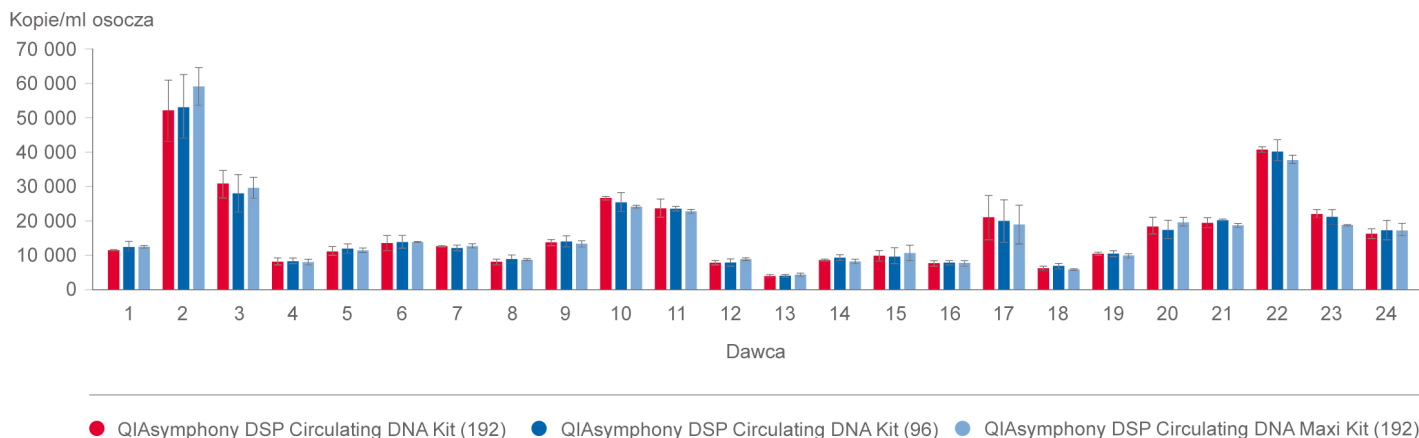
Ryzyko wystąpienia potencjalnego zanieczyszczenia negatywnych próbek osocza podczas procesu izolacji zostało ocenione poprzez wykonanie analizy uzyskanych eluatów przy użyciu reakcji real-time PCR ukierunkowanej na gen SRY1 swoisty dla chromosomu Y (protokół dla próbek o objętości 1 ml i 4 ml) i sekwencji swoistej dla genu GFP (protokół dla próbek o objętości 10 ml).

Nie wykryto zanieczyszczenia krzyżowego spowodowanego przeniesieniem między próbkami, między partiami oraz między cyklami przetwarzania.

Równoważna izolacja ccfDNA dla trzech zestawów QIASymphony DSP Circulating DNA Kit

Równoważną skuteczność zestawów QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192), nr kat. 937556, QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96), nr kat. 937555 i QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192), nr kat. 937566 oceniono przy użyciu próbek pobranych od 24 pojedynczych dawców w celu izolacji ccfDNA z osocza o objętości 2 ml lub 6 ml uzyskanego z probówek Streck. Uzysk ccfDNA został określony przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR ukierunkowanego na sekwencję kodującą cząsteczkę 18S rybosomalnego RNA (Ryc. 10).

Różnice w uzyskach (kopie/ml) odzwierciedlają silną zależność stężenia ccfDNA zwykle obecnego w osoczu o tej samej objętości.



Ryc. 10. Równoważna skuteczność izolacji ccfDNA dla trzech zestawów QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. Próbkę krwi od 24 pojedynczych dawców zostały pobrane do probówek Cell-Free DNA BCT (Streck). CcfDNA został wyizolowany z osocza o objętości 2 ml przy użyciu zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192) i zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96) oraz z osocza o objętości 6 ml przy użyciu zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192). Dla każdego zestawu i dawcy przeprowadzono trzy powtórzenia izolacji ccfDNA i otrzymano łącznie dziewięć punktów danych na dawcę. Uzysk ccfDNA został oznaczony ilościowo przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR ukierunkowanego na sekwencję kodującą cząsteczkę 18S. Wyniki zostały obliczone jako liczba kopii sekwencji docelowej na mililitr wejściowej próbki osocza.

Skuteczność trzech zastosowań zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit jest równorzędna. Pomiarów dokonywano przy użyciu wartości wyrażonych jako liczba kopii na mililitr. Stosunek różnic dla zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192), QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192) i QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96) przedstawiono w Tabeli 5.

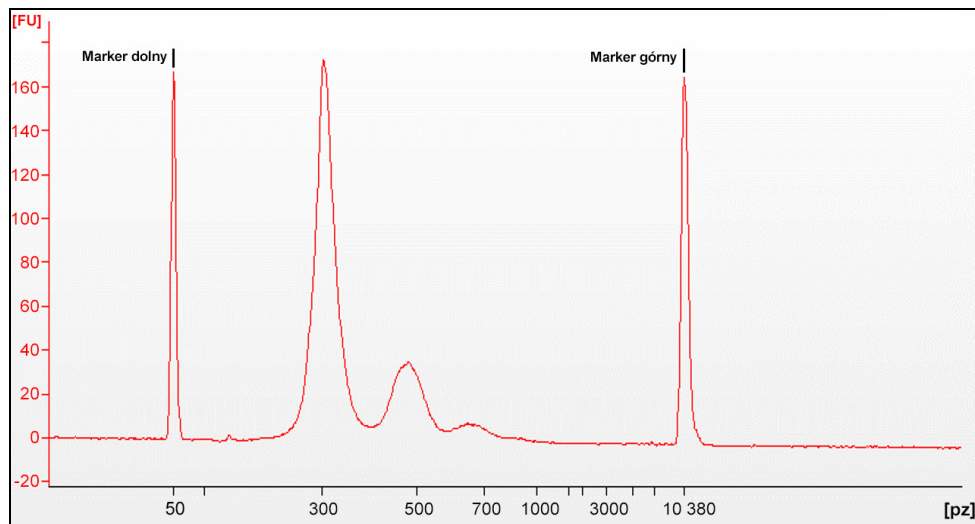
Tabela 5. Odwrotnie przekształcona różnica i dwustronny 95-procentowy przedział ufności w celu uzyskania stosunku średniej geometrycznej ($N = 216$)

Obliczona różnica	Oszacowana wartość	Dolna dwustronna granica 95-procentowego przedziału ufności	Górna dwustronna granica 95-procentowego przedziału ufności
QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96) / QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192)	1,012	0,969	1,057
QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192) / QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192)	1,002	0,960	1,047
QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96) / QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192)	1,009	0,964	1,056

Zgodność z różnymi dalszymi procedurami analitycznymi

Standardowe dalsze procedury analityczne były wykorzystywane podczas opracowywania zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit w celu wykazania zgodności wyizolowanych kwasów nukleinowych z szeregiem różnych technologii stosowanych w tych procedurach, w tym reakcją real-time PCR (patrz Ryc. 1–5 i Ryc. 8–10), fluorometrią przy użyciu aparatu Qubit Fluorometer (oznaczenie białka oraz wysoce czułe oznaczenie dsDNA), tworzeniem bibliotek (patrz Ryc. 11) oraz sekwencjonowaniem nowej generacji (next generation sequencing, NGS).





Elektroforegram na Ryc. 11 pokazuje przykład udanej ligacji adaptera i późniejszej amplifikacji ccfDNA. Obok wyraźnego pików przy 300 pz dla nukleosomalnego ccfDNA (około 165 pz plus po około 70 pz dla poszczególnych adapterów) widoczny jest również dinukleosomalny pik przy około 470 pz.



Ryc. 11. Biblioteka DNA dla ccfDNA (jednego dawcy) wyizolowanego przy użyciu zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit. CcfDNA został wyizolowany z osocza pobranego do próbek firmy Streck przy użyciu protokołu dla próbek o objętości 4 ml. Uzyskane 35 µl eluatu zostało następnie przeniesione do zestawu NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit (Biolabs). Po amplifikacji i oczyszczeniu materiału przy użyciu produktu AMPure XP 1 µl eluatu został przeanalizowany przy użyciu zestawu Agilent 7500 DNA Kit.

Symbole

Poniższe symbole znajdują się w instrukcji użycia lub na opakowaniu i etykietach:

Symbol	Definicja symbolu
	Ten produkt spełnia wymogi Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego 2017/746 w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro.
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Numer katalogowy
Rn	R oznacza wydanie instrukcji użycia, a n to numer wydania
	Producent

Historia zmian

Wydanie

Opis

R1, czerwiec 2022 r.

Wersja 2, wydanie 1

- Aktualizacja do wersji 2 w celu spełnienia wymagań w zakresie IVDR
- W częściach dotyczących substancji zakłócających, zanieczyszczenia krzyżowego oraz zgodności dodano informacje na temat dalszych procedur analitycznych

R2, czerwiec 2024 r.

- Usunięto wersję dokumentu z historii wersji
- Zaktualizowano dokument w celu dodania danych dotyczących działania zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Maxi Kit (192) i QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (96) w połączeniu ze scenariuszami BioScript dla próbek o objętości 6 ml, 8 ml i 10 ml
- Dodano dane dotyczące działania dla scenariusza BioScript dla próbek o objętości 1 ml

Aktualne informacje licencyjne oraz zastrzeżenia dotyczące poszczególnych produktów znajdują się w instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika odpowiedniego zestawu firmy QIAGEN. Instrukcje obsługi i podręczniki użytkownika zestawów firmy QIAGEN są dostępne pod adresem www.qiagen.com. Można je także zamówić w serwisie technicznym firmy QIAGEN lub u lokalnego dystrybutora.

Znaki towarowe: 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 lub podmioty zależne); PAXgene® Blood ccfDNA Tube, PreAnalytix. Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały wyraźnie oznaczone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa.

HB-3034-D01-002 © 2024 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.