



Czerwiec 2022 r.

# QIAAsymphony® DSP DNA Kit — Instrukcja użycia (Parametry skuteczności)

Wersja 2



Do diagnostyki in vitro

Do użytku z zestawami QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit i QIAAsymphony DSP DNA Midi Kit



937236, 937255



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Niemcy

R1

Dokument Parametry skuteczności jest dostępny w postaci elektronicznej i można go znaleźć na karcie materiałów źródłowych na stronie produktu pod adresem [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Wprowadzenie ogólne

Zestawy QIASymphony DSP DNA Kit są przeznaczone do stosowania wyłącznie z aparatem QIASymphony SP.

Zestawy QIASymphony DSP DNA Mini Kit zawierają odczynniki do zautomatyzowanego oczyszczania całkowitego DNA z ludzkiej krwi pełnej, kożuszka leukocytno-płytkowego, tkanek i próbek tkanek utrwalonych w formalinie, zatopionych w parafinie (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE), a także wirusowego DNA z ludzkiej krwi pełnej. Zestawy QIASymphony DSP DNA Midi Kit zawierają odczynniki do zautomatyzowanego oczyszczania całkowitego DNA z ludzkiej krwi pełnej i kożuszka leukocytno-płytkowego. Nie ustalono jednak parametrów skuteczności dla każdej próbki do pobierania krwi lub każdego typu tkanki. Muszą one zostać zwalidowane przez użytkownika.

Technologia cząstek magnetycznych umożliwia otrzymanie oczyszczonych kwasów nukleinowych o wysokiej jakości, wolnych od białek, nukleaz i innych zanieczyszczeń. Oczyszczone kwasy nukleinowe są gotowe do bezpośredniego użytku do dalszych zastosowań, np. w reakcjach amplifikacji (PCR). Aparat QIASymphony SP wykonuje wszystkie etapy procedury oczyszczania. W jednym cyklu można przetworzyć do 96 próbek w partiach zawierających do 24 próbek.

W kolejnych sekcjach przedstawiono dane dotyczące skuteczności dla różnych zastosowań.

## Parametry skuteczności

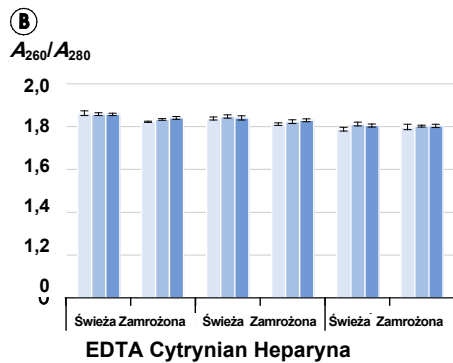
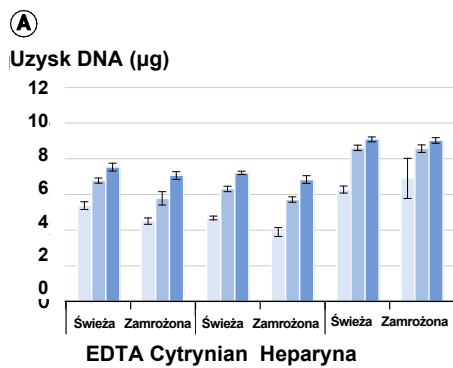
**Uwaga:** Parametry skuteczności w znacznym stopniu zależą od różnych czynników i są powiązane z określonymi dalszymi etapami procedury. Dla zestawów QIASymphony DSP DNA Mini i Midi Kit zostały one ustalone w połączeniu z przykładowymi dalszymi zastosowaniami. Jednak przed dalszymi etapami procedur wykorzystywane są różne metody izolacji kwasów nukleinowych z materiałów biologicznych. W ramach opracowywania dalszych etapów procedur należy określić parametry skuteczności, np. dotyczące zanieczyszczenia krzyżowego lub precyzji testu. Dlatego obowiązkiem użytkownika jest walidacja całej procedury w celu uzyskania odpowiednich parametrów skuteczności.

### Podstawowa skuteczność i zgodność z różnymi dalszymi zastosowaniami

#### Krew i kożuszek leukocyтарно-пłytkowy — izolacja DNA

##### Uzysk DNA

Podstawową skuteczność zestawu QIASymphony DSP DNA Mini Kit oceniono przy użyciu różnych próbek do pobierania krwi i antykoagulantów, jak również świeżej i zamrożonej ludzkiej krwi pełnej. Próbki krwi pełnej zostały pobrane od 3 zdrowych dawców (liczba białych krwinek [white blood cell, WBC]: od 4,0 do 11,0 x 10<sup>6</sup> komórek/ml) do 3 różnych typów próbek: EDTA, 10 ml BD™ Vacutainer® 16 x 100 mm (K2-EDTA); cytrynian, 2,7 ml Sarstedt® S-Monovette® 9NC Tube 13 x 75 mm (cytrynian); heparyna, 7,5 ml Sarstedt S-Monovette 15 x 92 mm (heparyna litowa). Używano krwi świeżej (przechowywanej w temperaturze 2–8°C) lub zamrożonej (przechowywanej w temperaturze -20°C). Genomowy DNA oczyszczono z próbek o objętości 200 µl, wykonując po 4 powtórzenia na dawkę i typ próbki z wykorzystaniem zestawu QIASymphony DSP DNA Mini Kit i protokołu Blood 200 DSP, przy objętości elucji równej 200 µl. Uzyski i czystość DNA określono za pomocą analizy spektroskopowej (Ryc. 1).

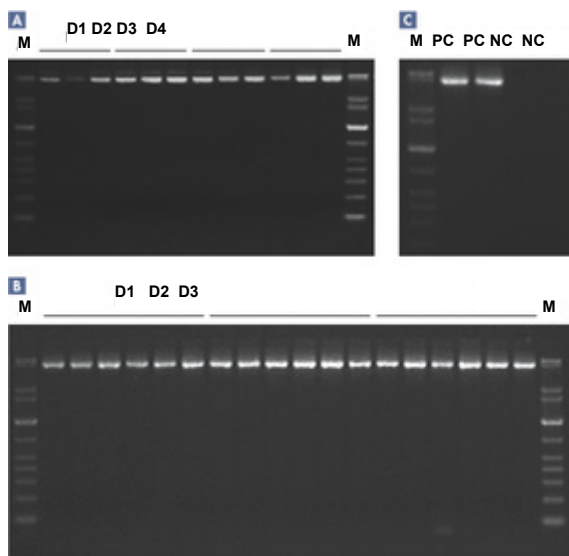


■ Dawca 1 ■ Dawca 2 ■ Dawca 3

**Ryc. 1. Uzysk i czystość DNA przy stosowaniu różnych probówek do pobierania próbek i antykoagulantów ze świeżą i zamrożoną pełną krwią ludzką. A** Uzysk DNA, słupki przedstawiają bezwzględny uzysk DNA wraz z odchyleniem standardowym. **B** Czystość DNA, słupki przedstawiają czystość DNA wraz z odchyleniem standardowym.

## Integralność DNA

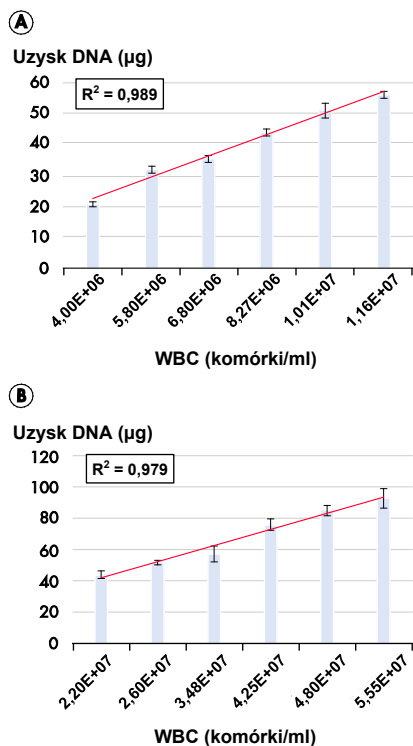
Produkty reakcji long-range PCR (5 kb) amplifikowano za pomocą oznaczenia LongRange PCR (Ryc. 2).



**Ryc. 2. Badanie integralności DNA za pomocą reakcji long-range PCR.** M, marker QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder. **A** Krew pełną pobrano od 4 zdrowych dawców (D) do próbek BD K2E. Genomowy DNA do reakcji long-range PCR oczyszczono z porcji o objętości 200  $\mu$ l w trzech powtórzeniach, stosując zestaw QIASymphony DSP DNA Mini Kit i protokół Blood 200 DSP, przy objętości elucji równej 200  $\mu$ l. D1 = Dawca 1, D2 = Dawca 2, D3 = Dawca 3 i D4 = Dawca 4. **B** Krew pełną pobrano od 3 zdrowych dawców do próbek BD K2E i przygotowano kożuszek leukocyarno-płytkowy. Genomowy DNA oczyszczono z porcji o objętości 200  $\mu$ l w 6 powtórzeniach, stosując zestaw QIASymphony DSP DNA Mini Kit i protokół Buffy Coat 200 DSP, przy objętości elucji równej 200  $\mu$ l. D1 = Dawca 1, D2 = Dawca 2 i D3 = Dawca 3. **C** Kontrole: PC = kontrola pozytywna i NC = kontrola negatywna.

## Korelacja uzysku DNA z liczbą krwinek białych

Skuteczność zestawu QIASymphony DSP DNA w zastosowaniach wykorzystujących krew i kożuszek leukocyarno-płytkowy oceniono za pomocą próbek krwi i kożuszka leukocyarno-płytkowego obejmujących 6 różnych wartości WBC dla poszczególnych typów próbek. W przypadku krwi pełnej wartość WBC wynosiła od  $4 \times 10^6$  komórek/ml do  $11,6 \times 10^6$  komórek/ml, a w przypadku kożuszka leukocyarno-płytkowego od  $2,2 \times 10^7$  komórek/ml do  $5,6 \times 10^7$  komórek/ml. Uzyski DNA określono za pomocą analizy spektroskopowej i wykreślono względem wartości WBC (Ryc. 3).



**Ryc. 3. Korelacja uzysku DNA z liczbą krwinek białych.** **A** Genomowy DNA oczyszczono z próbki ludzkiej krwi pełnej o objętości 1 ml, stosując zestaw QIASymphony DSP DNA Midi Kit i protokół Blood 1000 DSP, przy objętości elucji równej 500 µl. Słupki przedstawiają bezwzględny uzysk DNA wraz z odchyleniem standardowym. **B** Genomowy DNA oczyszczono z próbki kożuszka leukocyтарно-platekowego o objętości 400 µl stosując zestaw QIASymphony DSP DNA Midi Kit i protokół Buffy Coat 400 DSP, przy objętości elucji równej 400 µl. Słupki przedstawiają bezwzględny uzysk DNA wraz z odchyleniem standardowym.

## Krew do badań pod kątem obecności wirusów

Badania trafności wykonano, rozcieńczając wstępnie oznaczone ilościowo materiały wzorcowe WHO wirusa CMV w ludzkiej krwi pełnej negatywnej względem wirusa CMV. Dla próbek z mianem wirusa CMV równym 90 IU na mililitr zaobserwowano współczynnik detekcji równy 100% (Tabela 1).

**Tabela 1. Czulość zastosowań protokołu QIASymphony DSP Virus Blood**

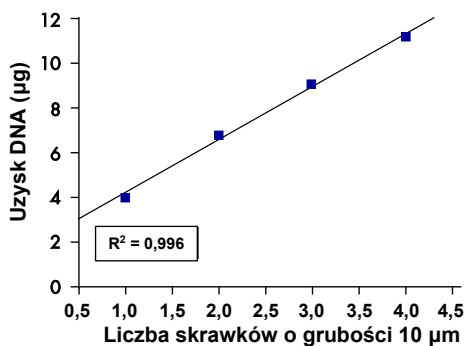
CMV (IU/ml)	Powtórzenia	Trafienia	% trafności
350	18	18	100,00
230	32	32	100,00
115	31	31	100,00
90	32	32	100,00
60	30	24	80,00
30	30	15	50,00
15	30	10	33,33
6	21	5	23,81
2	21	2	9,52
0	15	0	0,00

Ludzką krew pełną pobrano od 1 zdrowego dawcy negatywnego względem wirusa CMV do probówek BD K2E i dodano materiał wzorcowy WHO wirusa CMV, stosując różne miana. Wirusowe DNA oczyszczono, stosując zestaw QIASymphony DSP DNA Mini Kit i protokół Blood 200 DSP, przy objętości elucji równej 60 µl. Eluaty przeanalizowano za pomocą oznaczenia real-time PCR przeznaczanego do wykrywania obecności wirusa CMV.

## Tkanka i tkanka FFPE

### Uzysk DNA

Skuteczność zestawów QIAAsymphony DSP DNA w przypadku zastosowań wykorzystujących tkanki FFPE oceniono, wykorzystując sześć powtórzeń obejmujących od 1 do 4 skrawków FFPE o grubości 10 µm ze świeżo pociętej śledziny ludzkiej. Izolację DNA wykonywano za pomocą zestawu QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit w połączeniu z protokołem DSP przeznaczonym do tkanek o niskiej zawartości kwasów nukleinowych. Odparafinowanie i lizę wykonywano metodą wstępnego przygotowania z wykorzystaniem ksyleny/etanolu. DNA eluowano w 50 µl buforu do elucji, a uzysk DNA określano za pomocą analizy spektroskopowej (Ryc. 4).



**Ryc. 4. Korelacja uzysku DNA z liczbą skrawków tkanki FFPE.** Sześć powtórzeń obejmujących od 1 do 4 skrawków tkanki FFPE o grubości 10 µm ze śledziny ludzkiej poddano deparafinizacji metodą wstępnego przygotowania z wykorzystaniem ksyleny/etanolu. Izolację DNA wykonywano na aparacie QIAAsymphony SP, korzystając z zestawu QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit w połączeniu z protokołem DSP przeznaczonym do tkanek o niskiej zawartości kwasów nukleinowych przy objętości elucji równej 50 µl.

### Analiza mutacji biomarkerów za pomocą reakcji real-time PCR

Analizę mutacji biomarkerów wykonywano, wykorzystując DNA wyizolowane ze skrawków tkanek FFPE z okrężnicy ludzkiej i DNA wyizolowane z próbek tkanki płuca ludzkiego.

Do przygotowania próbki na potrzeby izolacji DNA z próbek tkanki FFPE użyto 3 skrawków o grubości 10 µm z okrężnicy ludzkiej. Izolację DNA wykonywano, stosując roztwór Deparaffinization Solution do wstępnego przygotowania oraz protokół DSP przeznaczony do tkanek o niskiej zawartości kwasów nukleinowych, przy objętości elucji równej 100 µl. Analizę mutacji biomarkera KRAS wykonywano za pomocą oznaczenia real-time PCR przeznaczonego do wykrywania mutacji w genie KRAS zgodnie z instrukcją obsługi oznaczenia. Wartości  $C_T$  oznaczenia kontrolnego mieściły się w zdefiniowanym zakresie, a analiza pod kątem wykrywania mutacji wykazała substytucję aminokwasu w kodonie 12, na którą wskazuje wartość  $\Delta C_T$  równa 4,17, która jest niższa niż zdefiniowana dla detekcji mutacji 12SER wartość odcięcia równa 8 (Tabela 2).

**Tabela 2. Wyniki analizy mutacji biomarkera KRAS wykonywanej na tkance FFPE**

Próbka	Reakcja	Docelowa wartość C <sub>T</sub>	Wartość C <sub>T</sub> kontroli wewnętrznej	ΔC <sub>T</sub> *
Kontrola bez matrycy	Kontrola	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	–
Wzorzec	Kontrola	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
Tkanka FFPE (okrężnica ludzka)	Kontrola	24,94	31,98	–
	12ALA	n.d.	32,42	–
	12ASP	n.d.	32,73	–
	12ARG	n.d.	33,05	–
	12CYS	n.d.	32,74	–
	12SER	29,11	32,34	4,17
	12VAL	n.d.	32,81	–
	13ASP	n.d.	33,20	–

\*  $\Delta C_T = M C_T - C C_T$ , gdzie M oznacza mutację, a C kontrolę; n.d. — nie wykryto.

Do przygotowania próbki na potrzeby izolacji DNA z próbek zamrożonej tkanki użyto 25 mg tkanki płuca ludzkiego, stosując protokół DSP przeznaczony do tkanek o wysokiej zawartości kwasów nukleinowych, przy objętości elucji równej 200  $\mu$ l. Analizę mutacji biomarkera EGFR wykonano za pomocą oznaczenia real-time PCR przeznaczonego do wykrywania mutacji w genie EGFR. Analizę kontroli oraz analizę pod kątem wykrywania mutacji przeprowadzono zgodnie z opisem w instrukcji obsługi oznaczenia. Wyniki wykazały delecję w obrębie genu EGFR, na co wskazuje wartość  $\Delta C_T$  równa 2,47, która jest niższa niż zdefiniowana dla detekcji mutacji wartość odcięcia równa 12 (Tabela 3).



**Tabela 3. Wyniki analizy mutacji biomarkera EGFR wykonywanej na zamrożonej tkance**

Próbka	Reakcja	Docelowa wartość C <sub>T</sub>	Wartość C <sub>T</sub> kontroli wewnętrznej	ΔC <sub>T</sub> *
Kontrola bez matrycy	Kontrola	0,00	31,71	–
	T790M	0,00	32,36	–
	Delecje	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	–
Wzorzec	Kontrola	28,78	31,05	–
	T790M	30,08	31,13	1,30
	Delecje	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
Tkanka (płuco ludzkie)	Kontrola	25,76	31,23	–
	T790M	n.d.	31,99	–
	Delecje	28,23	30,99	2,47
	L858R	n.d.	31,33	–
	L861Q	n.d.	31,98	–
	G719X	n.d.	32,06	–
	S768I	n.d.	31,88	–
	Ins	n.d.	31,62	–

\* ΔC<sub>T</sub> = M C<sub>T</sub> - C C<sub>T</sub>, gdzie M oznacza mutację, a C kontrolę; n.d. — nie wykryto.

## Powtarzalność i odtwarzalność

### Krew — izolacja DNA

Izolację DNA wykonywano, stosując protokół Blood 200 DSP przy objętości elucji równej 200 μl. Powtarzalność oceniono w następujący sposób: jeden operator wykonywał 3 odrębne testy (każdy po 96 próbek) w 3 różnych dniach, przy czym każdy test zawierał 4 partie po 24 próbki (Tabela 4 i Tabela 5).

Odtwarzalność oceniono w następujący sposób: 3 różnych operatorów wykonywało 3 odrębne testy (każdy po 96 próbek) w 3 różnych dniach na różnych aparatach QIA Symphony SP, przy czym każdy test zawierał 4 partie po 24 próbki (Tabela 6 i Tabela 7).

**Tabela 4. Wyniki oceny powtarzalności**

Test	Partia	n	Średni uzysk DNA (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
Łącznie	–	288	4,96	–	–

n = liczba powtórzeń; SD = odchylenie standardowe; CV = współczynnik zmienności.

**Tabela 5. Dane precyzji uzyskane na potrzeby oceny powtarzalności**

	SD	CV
Między partiami w obrębie jednego testu	0,25	4,95
Ogólna dokładność powtórzeń	0,26	5,18

SD = odchylenie standardowe; CV = współczynnik zmienności.

**Tabela 6. Wyniki oceny odtwarzalności**

Test	Partia	n	Średni uzysk DNA (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
Łącznie	–	288	5,38	–	–

n = liczba powtórzeń; SD = odchylenie standardowe; CV = współczynnik zmienności.

**Tabela 7. Dane precyzji uzyskane na potrzeby oceny odtwarzalności**

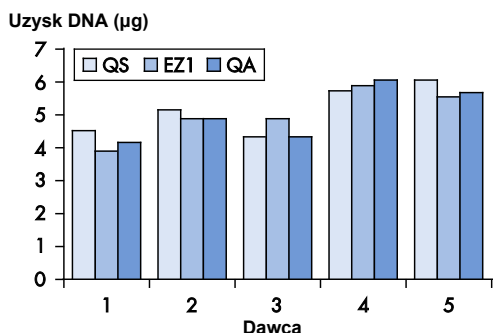
	SD	CV
Między partiami w obrębie jednego testu	0,25	4,73
Ogólna dokładność powtórzeń	0,38	7,03

SD = odchylenie standardowe; CV = współczynnik zmienności.

## Analiza porównawcza skuteczności

### Krew — izolacja DNA

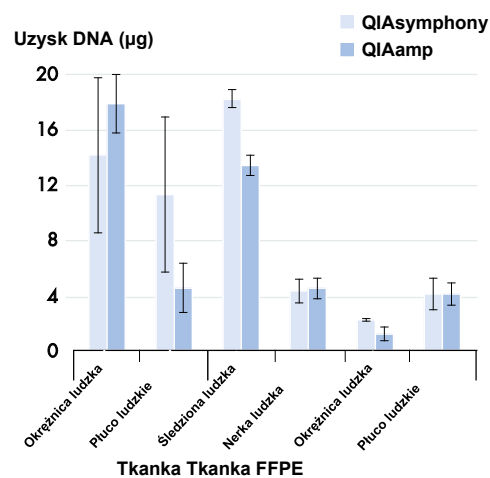
Przeprowadzono analizę porównawczą systemu do analizy krwi QIASymphony DSP DNA w odniesieniu do systemu do analizy krwi EZ1<sup>®</sup> DSP DNA oraz procedury przygotowania ręcznego za pomocą zestawu QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit. Oczyszczono DNA pochodzące z różnych próbek krwi i przeprowadzono analizę pod kątem uzysku DNA (Ryc. 5).



**Ryc. 5. Porównanie uzysków DNA między różnymi systemami oczyszczania DNA z krwi.** Krew pełną pobrano od 5 zdrowych dawców do próbek BD K2E. Dla wszystkich metod stosowano objętości wejściowe próbek równe 200 µl i objętości elucji równe 200 µl. QS = zestaw QIASymphony DSP DNA Mini Kit i protokół Blood 200 DSP; EZ1 = aparat EZ1 Advanced XL z wykorzystaniem zestawu EZ1 DSP DNA Blood Kit; QA = zestaw QIAamp DNA Blood Mini Kit. Słupki przedstawiają bezwzględny uzysk DNA dla każdej próbki.

### Tkanka i tkanka FFPE

Skuteczność zestawu QIASymphony DSP DNA Mini Kit porównano do skuteczności zestawu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit do ręcznego wykonywania oznaczeń oraz zestawu QIAamp DSP DNA Mini Kit, wykorzystując jako materiał próbki odpowiednio tkankę FFPE i świeże oraz zamrożone tkanki. Ręczne i zautomatyzowane przygotowanie próbek, jak również oznaczenie ilościowe uzysków DNA, wykonywano jednocześnie. Uzyski DNA po izolacji z próbek świeżych/zamrożonych tkanek i tkanek FFPE przy zastosowaniu zestawu QIASymphony DSP DNA Mini Kit, zestawu QIAamp DSP DNA Mini Kit (tkanka) i zestawu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (tkanka FFPE) przedstawiono na Ryc. 6.



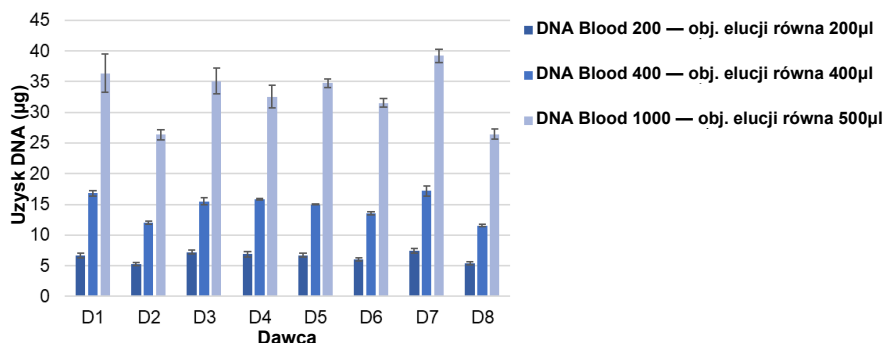
**Ryc. 6. Izolacja DNA z próbek tkanki i tkanki FFPE.** W celu uzyskania próbek świeżych/zamrożonych tkanek pocięto płuco i okrężnicę ludzką na 6 kawałków o masie 25 mg. Do przygotowania próbek za pomocą aparatu QIASymphony SP w połączeniu z protokołem DSP przeznaczonym do tkanek o wysokiej zawartości kwasów nukleinowych wykorzystano po trzy kawałki z każdego typu tkanki. Izolację DNA z pozostałych próbek wykonywano za pomocą zestawu QIAamp DSP DNA Mini Kit. DNA eluowano w objętości 200 µl, a uzysk DNA określano za pomocą analizy spektroskopowej. W celu izolacji DNA z tkanki FFPE przygotowano 12 powtórzeń zawierających 3 skrawki o rozmiarze 10 µm z tkanek FFPE różnych narządów ludzkich. Sześć próbek użyto do przygotowania próbek za pomocą aparatu QIASymphony SP w połączeniu z wstępnym przygotowaniem za pomocą roztworu Deparaffinization Solution oraz protokołem DSP przeznaczonym do tkanek o niskiej zawartości kwasów nukleinowych. Izolację DNA z pozostałych próbek wykonywano za pomocą zestawu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. DNA eluowano w objętości 50 µl, a uzysk DNA określano za pomocą analizy spektroskopowej. Słupki przedstawiają bezwzględny uzysk DNA wraz z odchyleniem standardowym.

## Zakres próbek wejściowych/objętości wyjściowych eluatów

### Krew — izolacja DNA

Porównano różne próbki wejściowe i objętości wyjściowe eluatów w przypadku zastosowań wykorzystujących krew do izolacji DNA, stosując próbki krwi pochodzące od dawców, których liczba krwinek białych mieściła się w zakresie od  $5,0$  do  $8,0 \times 10^6$  komórek/ml.

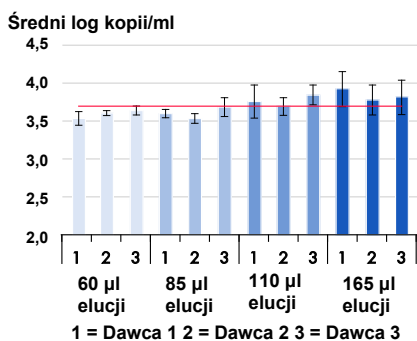
Krew pełną pobrano od 8 zdrowych dawców do probówek BD K2E. DNA oczyszczono z 6 powtórzeń, przy każdym używając zestawu QIASymphony DSP DNA Mini/Midi Kit i protokołu DNA Blood 200 DSP z objętością elucji równą  $200 \mu\text{l}$ , protokołu DNA Blood 400 DSP z objętością elucji równą  $400 \mu\text{l}$  oraz protokołu DNA Blood 1000 DSP z objętością elucji równą  $500 \mu\text{l}$  (Ryc. 7).



**Ryc. 7. Porównanie różnych próbek wejściowych i objętości elucji w przypadku systemów do oczyszczania DNA z krwi.** Krew pełną pobrano od 8 zdrowych dawców do probówek BD K2E. Izolację DNA przeprowadzono z wykorzystaniem protokołu DNA Blood 200 z objętością elucji równą  $200 \mu\text{l}$ , protokołu DNA Blood 400 z objętością elucji równą  $400 \mu\text{l}$  oraz protokołu DNA Blood 1000 z objętością elucji równą  $500 \mu\text{l}$ . Uzysk DNA określono za pomocą analizy spektroskopowej. Słupki przedstawiają bezwzględny uzysk DNA (średnią wartość wraz z odchyleniem standardowym) dla każdego dawcy.

### Krew do badań pod kątem obecności wirusów

Krew pełną pobrano do probówek BD K2E od 3 zdrowych dawców, których liczba krwinek białych wynosiła od  $4,0$  do  $11,0 \times 10^6$  komórek/ml, a następnie dodano materiał wzorcowy wirusa CMV (miano  $3,7 \log$  kopii/ml). Wirusowe DNA oczyszczono z 7 powtórzeń, przy każdym używając zestawu QIASymphony DSP DNA Mini Kit i protokołu Virus Blood 200 DSP oraz 4 różnych objętości elucji (Ryc. 8).



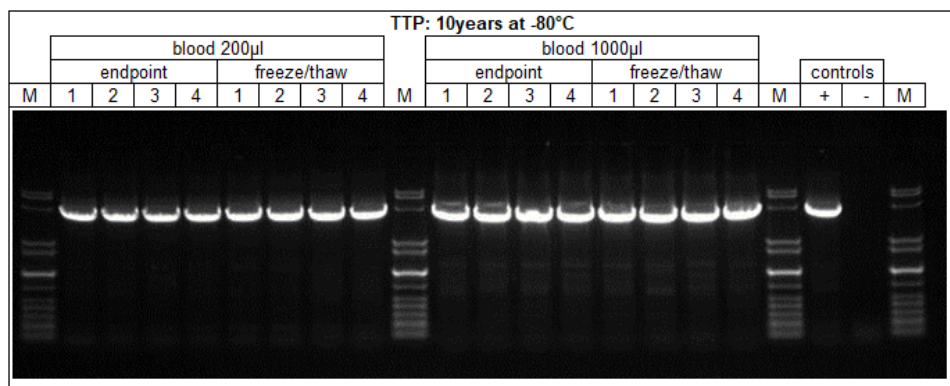
**Ryc. 8. Porównanie oznaczenia ilościowego wirusowego DNA dla różnych objętości elucji.** Eluaty z każdej próbki pobranej od dawcy i objętości elucji ( $60$ ,  $85$ ,  $110$  i  $165 \mu\text{l}$ ) przeanalizowano za pomocą oznaczenia real-time PCR przeznaczanego do wykrywania obecności wirusa CMV. Czerwona linia przedstawia miano docelowe, a słupki średni log kopii na mililitr wraz z odchyleniem standardowym.

## Stabilność eluatu

**Uwaga:** Stabilność eluatu w znacznym stopniu zależy od różnych czynników i jest powiązana z określonymi dalszymi etapami procedury. Dla zestawów QIASymphony DSP Mini i Midi Kit została ona ustalona w połączeniu z przykładowymi dalszymi etapami procedur. Do obowiązków użytkownika należy zapoznanie się z instrukcjami określonych dalszych procedur wykorzystywanych w laboratorium i/lub walidacja całej procedury w celu ustalenia odpowiednich warunków przechowywania.

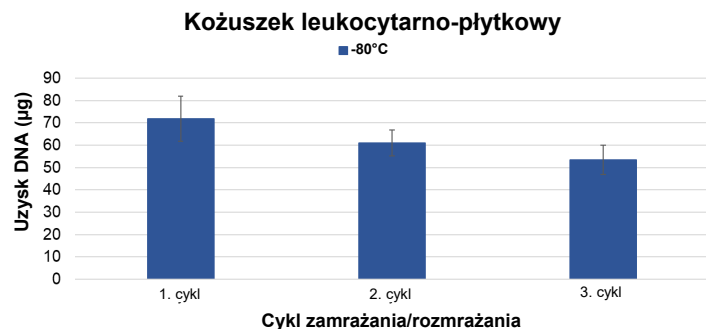
## Krew i kożuszek leukocytno-płytkowy — izolacja DNA

Stabilność eluatów w przypadku zastosowań wykorzystujących krew do izolacji DNA została przetestowana przy użyciu eluatów pochodzących z testów QS przeprowadzonych z wykorzystaniem protokołu DNA Blood 200 z objętością elucji równą 200 µl oraz protokołu DNA Blood 1000 z objętością elucji równą 500 µl. Eluaty przechowywano w probówkach o pojemności 2 ml firmy Sarstedt w temperaturze pokojowej, 2–8°C, -20°C oraz -80°C. Uzysk i czystość DNA określono za pomocą analizy spektroskopowej. Integralność DNA została oceniona na podstawie elektroforezy żelowej i oznaczenia LongRange PCR (Ryc. 9).



**Ryc. 9. Stabilność eluatu w przypadku próbek krwi przeznaczonych do izolacji DNA.** DNA zostało oczyszczone z wykorzystaniem protokołów DNA Blood 200 µl i 1000 µl. Eluaty były przechowywane w temperaturze -80°C w probówkach firmy Sarstedt o pojemności 2 ml. Przeanalizowano cztery powtórzenia. Integralność DNA została przetestowana za pomocą reakcji long-range PCR. Ryciny przedstawiają wyniki po przechowywaniu przez 10 lat. M, marker QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder.

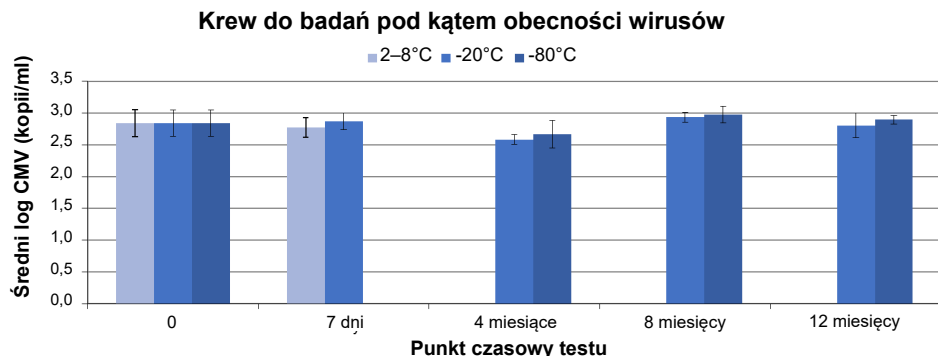
Stabilność eluatu w przypadku zastosowań wykorzystujących kożuszek leukocytno-płytkowy została przetestowana przy użyciu eluatów pochodzących z testów QS przeprowadzonych z wykorzystaniem protokołu BC 400 µl i objętości elucji równej 200 µl. Eluaty były przechowywane w probówkach firmy Sarstedt o pojemności 2 ml i statywach na mikroprobówki do elucji w temperaturze pokojowej, 2–8°C, -20°C oraz -80°C. Ponadto przeprowadzono do 3 cykli zamrażania/rozmarzania eluatów (Ryc. 10). Uzysk i czystość DNA określono za pomocą analizy spektroskopowej. Integralność DNA została oceniona na podstawie elektroforezy żelowej i oznaczenia LongRange PCR (objętość reakcyjna równa 50 µl).



**Ryc. 10. Cykle zamrażania/rozmarzania eluatów (kożuszek leukocytno-płytkowy).** DNA zostało oczyszczone z wykorzystaniem protokołu DNA BC 400 µl. Kożuszek leukocytno-płytkowy otrzymano z krwi z EDTA. Eluaty były przechowywane w probówkach firmy Sarstedt o pojemności 2 ml. Uzysk DNA został określony w punktach czasowych testu w tym samym eluacie dla 3 cykli zamrażania/rozmarzania. Uzysk DNA określono za pomocą analizy spektroskopowej. Słupki przedstawiają bezwzględny uzysk DNA (średnią wartość wraz z odchyleniem standardowym).

## Krew do badań pod kątem obecności wirusów

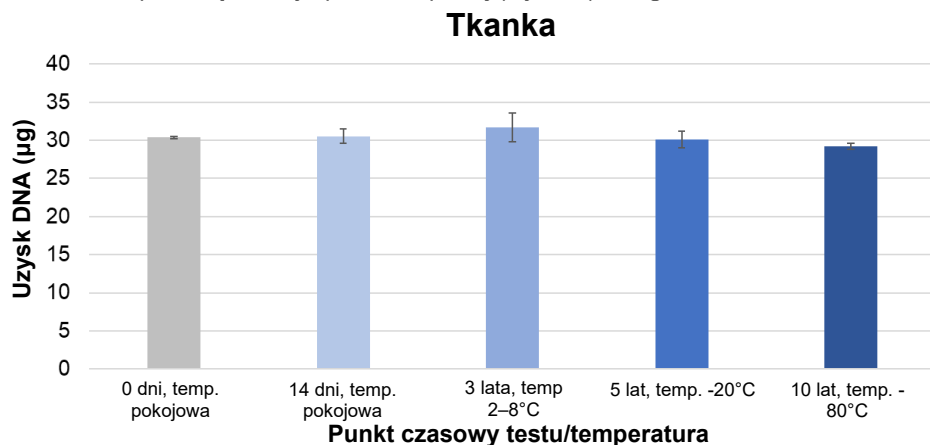
Stabilność eluatu w zastosowaniach wykorzystujących krew do badań pod kątem obecności wirusów została przetestowana przy użyciu eluatów pochodzących z testów QS przeprowadzonych z wykorzystaniem protokołu Virus Blood 200 i objętości elucji równej 60 µl. Jako materiału próbki użyto krwi z K<sub>2</sub> EDTA, do której dodano dostępny komercyjnie materiał wzorcowy wirusa CMV (miano 2,7 log kopii/ml). Eluaty były przechowywane w probówkach firmy Sarstedt o pojemności 2 ml w temperaturze 2–8°C, -20°C i -80°C. Eluaty zostały przeanalizowane przy użyciu oznaczenia do reakcji w czasie rzeczywistym na obecność wirusa CMV (Ryc. 11). Poniżej przedstawiono wyniki dla kilku punktów czasowych testu.



**Ryc. 11. Stabilność eluatu w przypadku zastosowań wykorzystujących krew do badań pod kątem obecności wirusów.** Próbkę krwi z EDTA, do której dodano dostępny komercyjnie materiał wzorcowy wirusa CMV, zostały oczyszczone z wykorzystaniem protokołu Virus Blood 200. Eluaty były przechowywane w różnych temperaturach w statywach na mikroprobówki do elucji i probówkach firmy Sarstedt o pojemności 2 ml. Przeanalizowano 4 powtórzenia na punkt czasowy testu. Słupki przedstawiają miano wirusa CMV (średnią wartość log wraz z odchyleniem standardowym).

## Tkanka

Stabilność eluatu w przypadku zastosowań wykorzystujących tkanki została przetestowana przy użyciu protokołu Tissue HC 200 µl i objętości elucji równej 200 µl. Jako materiału próbki użyto świeżej wątroby bydłowej. Eluaty przechowywano w probówkach o pojemności 2 ml firmy Sarstedt i w statywach na mikroprobówki do elucji w temperaturze pokojowej, 2–8°C, -20°C oraz -80°C. Uzysk i czystość DNA określono za pomocą analizy spektroskopowej (Ryc. 12). Integralność DNA została oceniona na podstawie elektroforezy żelowej.

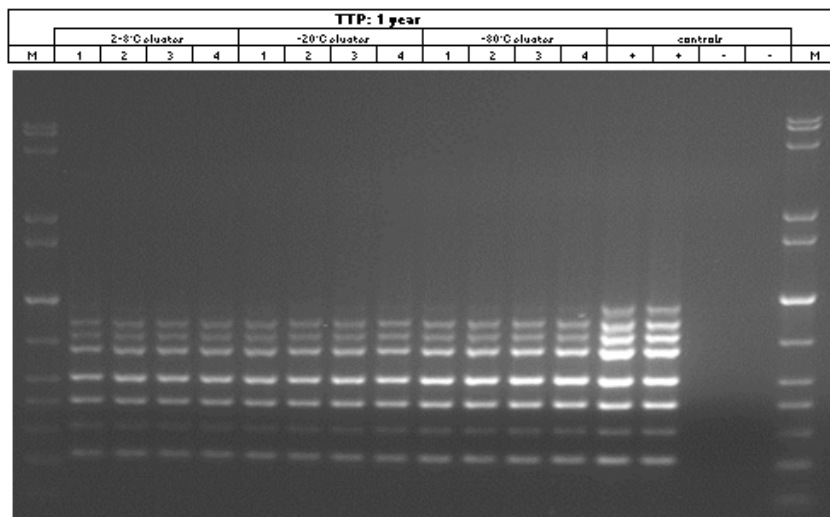


**Ryc. 12. Stabilność eluatu w przypadku tkanek.** DNA zostało oczyszczone z wykorzystaniem protokołu DNA Tissue HC z objętością elucji równą 200 µl. Jako materiału próbki użyto świeżej wątroby bydłowej. Eluaty były przechowywane w różnych temperaturach w statywach na mikroprobówki do elucji i probówkach firmy Sarstedt o pojemności 2 ml. Przeanalizowano 4 powtórzenia na punkt czasowy testu. Uzysk DNA określono za pomocą analizy spektroskopowej. Słupki przedstawiają bezwzględny uzysk DNA (średnią wartość wraz z odchyleniem standardowym).

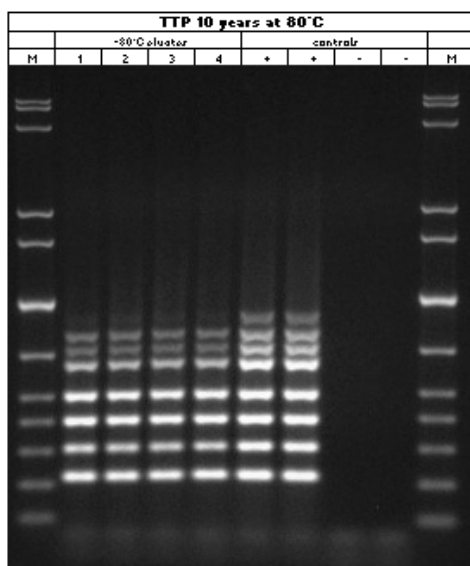
## Tkanka FFPE

Stabilność eluatu w przypadku zastosowań wykorzystujących tkanki FFPE została przetestowana przy użyciu protokołu Tissue LC 200  $\mu$ l i objętości elucji równej 100  $\mu$ l. Jako materiału próbki użyto dostępnej komercyjnie ludzkiej tkanki FFPE. Eluaty były przechowywane w probówkach firmy Sarstedt o pojemności 2 ml i statywach na mikroprobówki do elucji w temperaturze 2–8°C, -20°C oraz -80°C. Eluaty przeanalizowano przy użyciu wewnętrznego oznaczenia PCR typu 8-plex przeznaczonego dla materiału ludzkiego (Ryc. 13). Poniżej przedstawiono wyniki dla dwóch punktów czasowych testu.

A:



B:



**Ryc. 13. Stabilność eluatu w przypadku tkanek FFPE.** DNA zostało oczyszczone z wykorzystaniem protokołu DNA Tissue LC. Jako materiału próbki użyto dostępnej komercyjnie tkanki FFPE. Eluaty były przechowywane w różnych temperaturach w statywach na mikroprobówki do elucji i probówkach firmy Sarstedt o pojemności 2 ml. Przeanalizowano 4 powtórzenia na punkt czasowy testu. Eluaty przeanalizowano przy użyciu wewnętrznego oznaczenia PCR typu 8-plex przeznaczonego dla materiału ludzkiego.

## Substancje zakłócające

Wpływ inhibitorów, które mogą być obecne we krwi pełnej, na skuteczność procedury wykorzystującej krew do izolacji DNA, procedury wykorzystującej krew do badań pod kątem obecności wirusów oraz procedury wykorzystującej tkankę została przetestowana poprzez dodanie następujących substancji:

Tabela 8. Potencjalne substancje zakłócające przetestowane pod kątem różnych zastosowań

Substancje zakłócające	Stężenie	Krew	Krew do badań pod kątem obecności wirusów	Tkanka
Bilirubina	200 mg/l	√	√	√
Hemoglobina	200 g/l	√	√	
Trójglicerydy	30 g/l	√	√	√
Białko	120 g/l	√	√	√

**Uwaga:** Symbol „√” wskazuje, które materiały próbek zostały przetestowane pod kątem potencjalnych substancji zakłócających.

W przypadku hemoglobiny (200 g/l) i białka (120 g/l) określono poziomy obecne w próbce krwi i dodano dodatkową ilość hemoglobiny lub białka w celu osiągnięcia wskazanych stężeń, odpowiednio 200 lub 120 g/l. W przypadku bilirubiny (200 mg/l) i trójglicerydów (30 g/l) do próbek dodano całkowitą ilość każdej substancji w celu osiągnięcia wskazanych stężeń.

W przypadku tkanki całkowitą ilość poszczególnych substancji dodano bezpośrednio do lizatów. Nie określono stężeń bilirubiny, trójglicerydów ani białka w użytej próbce tkanki.

Wszelkie potencjalne substancje zakłócające (np. leki) i ich stężenia są ściśle powiązane z dalszymi zastosowaniami. Dlatego podczas weryfikacji dalszych etapów procedur, w których wykorzystywane są zestawy QIASymphony DSP DNA Mini i Midi Kit, należy wziąć pod uwagę wcześniejsze leczenie, jakiemu poddawany był pacjent.

**Uwaga:** W celu oceny jakości wyizolowanych kwasów nukleinowych przeprowadzono testy przy użyciu przykładowych procedur. Jednak wymagania w zakresie stopnia czystości (braku lub stężenia potencjalnych substancji zakłócających) mogą różnić się między procedurami, dlatego w ramach opracowywania dalszych etapów procedur, w których stosowane są zestawy QIASymphony DSP Mini i Midi Kit, należy zidentyfikować i przetestować odpowiednie substancje i ich stężenia.

**Uwaga:** Podczas opracowywania zestawu QIASymphony DSP DNA Midi Kit nie zauważono by heparyna miała negatywny wpływ na jego skuteczność. Jednak zgodnie z normą ISO 20186-2:2019(E) heparyna znajdująca się w probówkach do pobierania krwi może wpłynąć na czystość wyizolowanych kwasów nukleinowych, a potencjalne zanieczyszczenie eluatów spowodowane przeniesieniem może skutkować inhibicją w przypadku niektórych dalszych procedur. Dlatego obowiązkiem użytkownika jest sprawdzenie, czy heparyna ma negatywny wpływ na stosowaną procedurę.

### Krew i kożuszek leukocytno-płytkowy — izolacja DNA

Testy pod kątem zastosowań wykorzystujących krew do izolacji DNA zostały przeprowadzone z zastosowaniem protokołu DSP DNA 1000, który obejmuje największą objętość wejściową próbki, wykorzystując objętości elucji równe 200 i 500 µl.

Eluaty zostały przeanalizowane za pomocą analizy spektroskopowej pod kątem uzysku i czystości DNA. Zgodność z oznaczeniami PCR została przetestowana przy użyciu oznaczenia real-time PCR oraz PCR z pomiarem fluorescencji w punkcie końcowym.

Żadna z substancji wymienionych w Tabeli 9 nie spowodowała zakłóceń, jednak wysokie stężenie trójglicerydów (>30 g/l) w próbkach krwi może zmniejszyć uzysk gDNA.

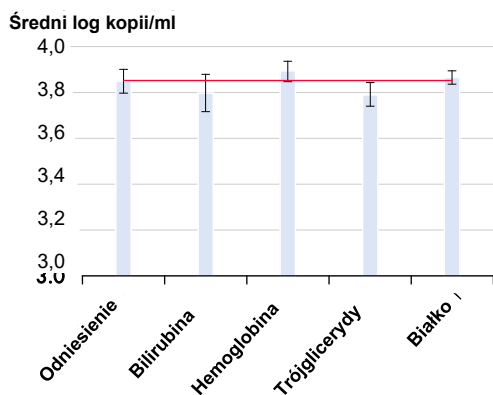


## Krew do badań pod kątem obecności wirusów

W przypadku zastosowania wykorzystującego krew do badań pod kątem obecności wirusów test przeprowadzono przy użyciu protokołu DSP Virus Blood 200 z objętością elucji równą 60 µl. Do próbek krwi negatywnych względem wirusa CMV dodano 500 kopii/ml (niskie stężenie) oraz 1x10 E+04 kopii/ml (wysokie stężenie, Ryc. 14) dostępnego komercyjnie materiału wzorcowego wirusa CMV.

Eluaty przeanalizowano za pomocą oznaczenia real-time PCR przeznaczonego do wykrywania obecności wirusa CMV.

Żadna z substancji wymienionych w Tabeli 9 nie spowodowała zakłóceń, jednak wysokie stężenie trójglicerydów (>30 g/l) w próbkach krwi może spowodować gorsze oczyszczanie wirusowego DNA.



**Ryc. 14. Test inhibitorow.** Krew pełną pobrano od 1 zdrowego dawcy do probówek BD K2E i dodano materiał wzorcowy wirusa CMV (miano 4,0 log kopii/ml). Przetestowano pięć próbek, dodając do nich potencjalne inhibitory, a następnie oczyszczono wirusowe DNA z każdej próbki w 4 powtórzeniach, używając zestawu QIASymphony DSP DNA Mini Kit i protokołu Virus Blood 200 DSP, przy objętości elucji równej 165 µl. Eluaty przeanalizowano za pomocą oznaczenia real-time PCR przeznaczonego do wykrywania obecności wirusa CMV. Czerwona linia przedstawia miano określone dla próbek odniesienia, do których nie dodano substancji hamujących, a słupki średni log kopii na mililitr wraz z odchyleniem standardowym.

## Tkanka

W przypadku tkanki przeznaczonej do izolacji DNA (świeżej i zamrożonej) test został przeprowadzony z zastosowaniem protokołu DSP DNA HC przy objętości elucji równej 200 µl.

Eluaty zostały przeanalizowane za pomocą analizy spektroskopowej pod kątem uzysku i czystości DNA. Zgodność z oznaczeniami PCR została przetestowana przy użyciu oznaczenia real-time PCR.

Żadna z substancji wymienionych w Tabeli 9 nie miała negatywnego wpływu na przygotowanie próbki.

## Tkanka FFPE

W przypadku tkanki FFPE test został przeprowadzony z zastosowaniem protokołu DSP DNA LC przy objętości elucji równej 50 µl.

Substancje (patrz Tabela 9) dodano bezpośrednio do lizatu.

**Tabela 9. Potencjalne substancje zakłócające przetestowane pod kątem różnych zastosowań**

Substancje zakłócające	Stężenie w lizacie
Ksylen	Maks. 11%
Etanol	Maks. 11%
Deparaffinization Solution	Maks. 11%
Parafina	Skrawek 0,1 µM

Eluaty zostały przeanalizowane za pomocą analizy spektroskopowej pod kątem uzysku i czystości DNA. Zgodność z oznaczeniami PCR została przetestowana przy użyciu oznaczenia real-time PCR oraz wewnętrznego oznaczenia PCR typu 8-plex przeznaczonego dla materiału ludzkiego.

Żadna z substancji wymienionych w Tabeli 9 nie miała negatywnego wpływu na przygotowanie próbki.

## Zanieczyszczenie krzyżowe





### Krew — izolacja DNA

Ryzyko zanieczyszczenia krzyżowego w przypadku stosowania zestawów QIAasymphony DNA w procedurach wykorzystujących próbki krwi zostało przeanalizowane poprzez wykonanie 96 testów próbek na aparacie QIAasymphony SP w partiach ułożonych w szachownicę (naprzemiennie próbki pozytywne i negatywne), między którymi występowałyby partie w pełni negatywne. W ramach systemu modelowego użyto próbek krwi pochodzących od mężczyzn (liczba krwinek białych  $\geq 1,0 \times 10^7$  komórek/ml) oraz kobiet (liczba krwinek białych między  $4,0 \times 10^6$  a  $9 \times 10^6$  komórek/ml). Próbki przygotowano zgodnie z protokołem Blood 1000 µl, który obejmuje największą objętość próbek. Potencjalne zanieczyszczenie negatywnych próbek pochodzących od kobiet podczas procesu izolacji zostało poddane ocenie poprzez wykonanie dalszej analizy eluatów pod kątem chromosomu Y metodą real-time PCR.

Nie wykryto zanieczyszczenia krzyżowego wynikającego z przeniesienia materiału między próbkami, partiami lub testami.

## Symbole

W niniejszym dokumencie pojawiają się poniższe symbole. Pełna lista symboli stosowanych w instrukcji użycia lub na opakowaniu i oznaczeniach znajduje się w instrukcji obsługi.

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 oznacza 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
- Dodano sekcje dotyczące substancji zakłócających, zanieczyszczenia krzyżowego, stabilności eluatów i zgodności z dalszymi zastosowaniami

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu firmy QIAGEN. Instrukcje obsługi i podręczniki użytkownika zestawów QIAGEN są dostępne pod adresem [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Można je także zamówić w serwisie technicznym firmy QIAGEN lub u lokalnego dystrybutora.

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAsymphony®, QIAamp®, EZ1®, UltraRun® (QIAGEN Group); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.). Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały wyraźnie oznaczone jako zastrzeżone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa.

06/2022 HB-3029-D01-001 © 2022 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

