



2022. gada jūnijs

QIAsymphony® DSP Circulating DNA Kit komplekta lietošanas instrukcijas (Veiktspējas raksturojums)

2. versija



Lietošanai in vitro diagnostikā
Lietošanai ar QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit



937556



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Vācija

R1

Veiktspējas raksturojums ir pieejams elektroniski, un tas ir atrodams izstrādājumu lapas cilnē "resource" (resursi), vietnē www.qiagen.com.

Vispārīgs ievads

QIASymphony DSP cirkulējošās DNS sistēmu veido lietošanai sagatavota in vitro sistēma cirkulējošas un šūnas nesaturošas DNS (ccfDNA) kvalitatīvai izdalīšanai no cilvēka plazmas un urīna.

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit komplektu ir paredzēts lietot tikai kopā ar QIASymphony SP instrumentu.

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit komplekts nodrošina reaģentus pilnīgi automātiskai un vienlaicīgai ccfDNA izdalīšanai no plaša klāsta cilvēka plazmas tipu (ar ccfDNA profila stabilizatoriem, piem., Cell-Free DNA BCT® no Streck®, kā arī bez ccfDNA profila stabilizatoriem, piem., EDTA stobriņi) un cilvēka urīna (ar ccfDNA profila stabilizatoriem un bez tiem). Taču veikspējas raksturojums nav noteikts ikkatram asins paraugu ņemšanas stobriņam, un lietotājam tas ir jāpārbauda.

Izdalītā ccfDNA ir saderīga ar plašu klāstu pakārtoto lietojumu, piemēram, PCR ķīmijas, uz fluorescenci balstītas kvantifikācijas analīzēm vai NGS.

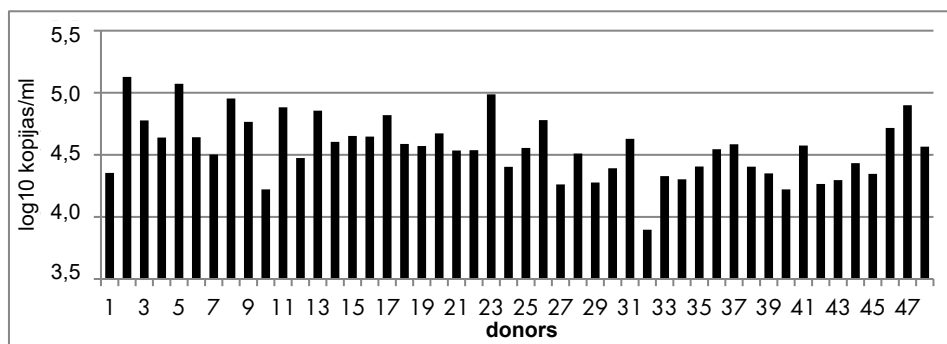
QIASymphony SP veic visas izdalīšanas procedūras darbības. Vienā izpildē tiek apstrādāts līdz 96 paraugiem, kas sadalīti partijās līdz 24 paraugiem. Urīna paraugiem var būt nepieciešama parauga manuāla iepriekšēja apstrāde.

Piezīme. Veikspējas raksturojums ir ļoti atkarīgs no dažādiem faktoriem, un tas ir saistīts ar konkrētu pakārtoto lietojumu. Tas ir noteikts QS DSP Circulating DNA Kit komplektam kopā ar tipiskajiem pakārtotajiem lietojumiem. Taču metodes nukleīnskābju izolēšanai no bioloģiska parauga tiek izmantotas kā priekšējā apstrāde vairākiem pakārtotajiem lietojumiem. Veikspējas parametri, piemēram, krusteniskā kontaminācija un izpildes precizitāte, ir jānosaka ikvienai šādai darbplūsmai kā daļa no pakārtoto lietojumu izstrādes. Tādēļ lietotājs ir atbildīgs par visas darbplūsmas validēšanu, lai noteiktu piemērotos veikspējas parametrus.

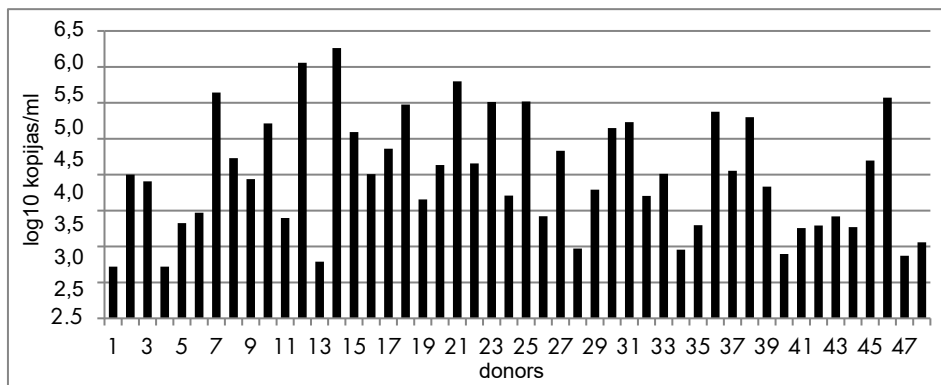
Pamata veikspēja

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit komplekta pamata veikspēja tika novērtēta, izmantojot 48 individuālus donorus attiecībā uz ccfDNA ekstrahēšanu no 4 ml Streck plazmas, kā arī no 4 ml stabilizēta urīna. ccfDNA iegūtais daudzums tika noteikts ar lokālo real-time PCR analīzi attiecībā uz 18S ribosomas RNS koda sekvenci.

Iegūtā daudzuma atšķirības (\log_{10} kopijas/ml), kas redzamas 1. attēlā (4 ml plazma) un 2. attēlā (4 ml urīns), atspoguļo no donora ļoti atkarīgās ccfDNA koncentrācijas, kas atrodamas vienādā daudzumā attiecīgā parauga materiāla.



1. attēls. ccfDNA iegūtais daudzums no plazmas 48 individuāliem donoriem. No asinīm, ko ziedojuši 48 individuāli donori, tika izveidots Cell-Free DNA BCT (Streck). CcfDNA tika ekstrahēta no 4 ml plazmas, izmantojot QIASymphony DSP Circulating DNA Kit komplektu. CcfDNA iegūtais daudzums tika kvantificēts, izmantojot lokālo real-time PCR analīzi attiecībā uz 18S koda sekvenci. Rezultāti tika aprēķināti kā mērķa kopijas uz mililitru plazmas ievades.



2. attēls. cfDNA iegūtais daudzums no urīna 48 individuāliem donoriem. No 48 individuāliem donoriem savāktais urīns tika stabilizēts, izmantojot Cell-Free DNA Urine Preserve® (Streck). CcfDNA tika ekstrahēta no 4 ml urīna, izmantojot QIASymphony DSP Circulating DNA Kit komplektu. CcfDNA iegūtais daudzums tika kvantificēts, izmantojot lokālo real-time PCR analīzi attiecībā uz 18S koda sekvenci. Rezultāti tika aprēķināti kā mērķa kopijas uz mililitru urīna ievades.

Izpildes precizitāte

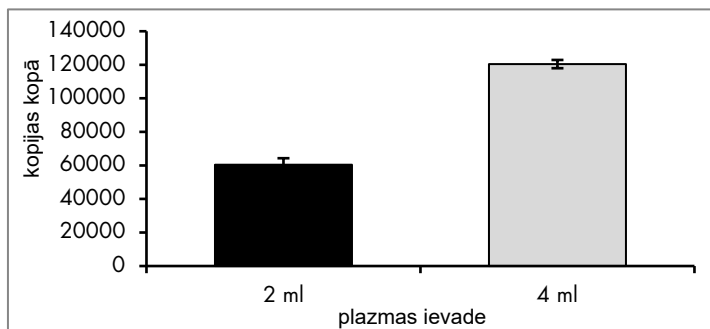
Variācijas koeficienti (VK) tika noteikti cilvēka ccfDNA izpildei no EDTA plazmas. Precizitātes analīzei ccfDNA tika kvantificēta, izmantojot lokālo real-time PCR analīzi attiecībā uz 18S koda sekvenci. Kopā tika veiktas 10 QIASymphony izpildes, katra 4 partijās (8 atkārtojumi katrai partijai). Precizitātes dati ir parādīti 1. tabulā.

1. tabula. Precizitātes aplēšu analīze

Precizitāte	VK (%)
Tajā pašā partijā	11,67
Atkārtojamība	13,14
Starposma precizitāte	13,14
Kopējā precizitāte	14,12

2 un 4 ml protokolu veikspējas līdzvērtīgums

Veikspējas līdzvērtīgums starp 2 un 4 ml parauga ievades protokoliem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit komplektam tika novērtēts, izmantojot endogēnu ccfDNA, kas ekstrahēta no cilvēka EDTA plazmas kopparauga. Kopā tika veiktas 8 neatkarīgas QIASymphony izpildes, katra 4 partijās ar 8 atkārtojumiem katrai partijai. QIASymphony DSP Circulating DNA Kit komplekta procedūras lineārais diapazons attiecībā uz 18S koda sekvenci tika noteikts ar iekšējo lokālo real-time PCR analīzi (3. attēls). Atšķirības attiecība 2 un 4 ml protokoliem ir parādīta 2. tabulā. (References protokols ir 4 ml parauga ievade).



3. attēls. Tika demonstrēta līdzvērtīga veikspēja 2 un 4 ml parauga ievades protokolu lietošanai. ccfDNA protokola lineārais diapazons tika noteikts, izmantojot 2 un 4 ml protokolu. ccfDNA iegūtais daudzums tika kvantificēts, izmantojot lokālo real-time PCR analīzi attiecībā uz 18S koda sekvenci. Rezultāti tika aprēķināti kā kopējais kopiju skaits uz protokolu.

2. tabula. Atšķirība starp 2 un 4 ml protokoliem (N = 256)

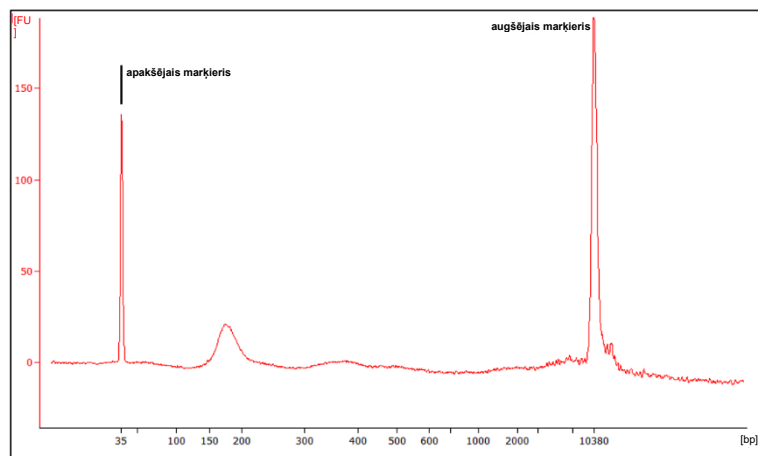
Parametrs	Vērtība
Aplēstā ģeometriskās vidējās vērtības attiecība, kā aprēķinātās kopijas/ml	1,01
Apakšējā 95% ticamības robeža	0,92
Augšējā 95% ticamības robeža	1,11
Kopējā precizitāte	14,12

Protokolu veiktspēja 2 un 4 ml paraugu ievadei ir līdzvērtīga, mērot aprēķinātajās kopijās uz mililitru.

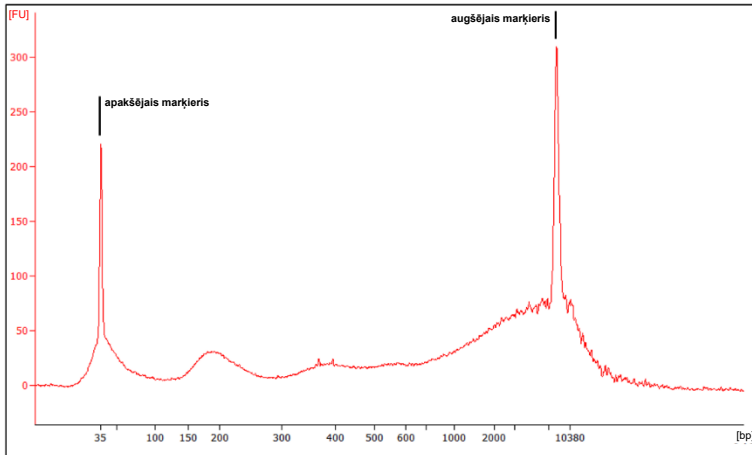
Lieluma sadalījums

Lai novērtētu paraugu izvades sadalījumu pēc lieluma, ccfDNA tika ekstrahēta no 4 ml parauga ievades, izmantojot QIASymphony DSP Circulating DNA Kit komplektu, eluētu 75 µl, un pēc tam 1 µl eluāta tika veikta lieluma analīze ar Agilent® 2100 Bioanalyzer, izmantojot Agilent High Sensitivity DNA Chip mikroshēmu. Kopā tika veikti 5 neatkarīgi atkārtējumi. Viens reprezentatīvs DNS profils ir parādīts plazmai 4. attēlā un urīnam 5. attēlā.

Elektroferogramma plazmai 4. attēlā parāda bieži novēroto virsotni pie aptuveni 165 bp, diapazonā no 145 līdz 196 bp — tas ir histona piesaistītās DNS garuma diapazons nukleosomā. Elektroferogramma urīnam 5. attēlā parāda šo dominējošo virsotni pie aptuveni 160 bp, un tā ir platāka, diapazonā no aptuveni 145 līdz 250 bp. Urīnam ir vēl arī otra virsotne diapazonā no aptuveni 20 līdz 100 bp (zemākās marķiera virsotnes līmenī), norādot uz ccfDNA frakciju ar augstāku fragmentēšanās pakāpi. Turklāt 5. attēlā ir redzams liels skaits garo DNS fragmentu no aptuveni 2 kb. Šādu genomisko DNS fragmentu pārpilnība urīna paraugā ir atrodama bieži, visticamāk, to izraisa genomiskās DNS atdalīšanās no urīnā esošajām šūnām.



4. attēls. ccfDNA lieluma sadalījums no plazmas (Bioanalyzer profils). ccfDNA tika ekstrahēta no 4 ml EDTA plazmas, izmantojot QIASymphony DSP Circulating DNA Kit komplektu; 1 µl eluāta tika veikta Agilent High Sensitivity DNA Chip analīze. x ass: bāzu pāra lielums (bp); y ass: fluorescences vienības (Fluorescence Unit, FU).

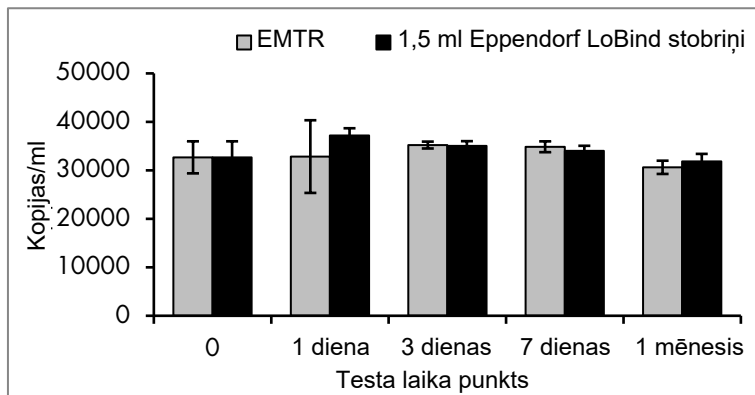


5. attēls. ccfDNA lieluma sadalījums no urīna (Bioanalyzer profils). ccfDNA tika ekstrahēta no 4 ml EDTA plazmas, izmantojot QIASymphony DSP Circulating DNA Kit komplektu; 1 µl eluāta tika veikta Agilent High Sensitivity DNA Chip analīze. x ass: bāzu pāra lielums (bp); y ass: fluorescences vienības (Fluorescence Unit, FU).

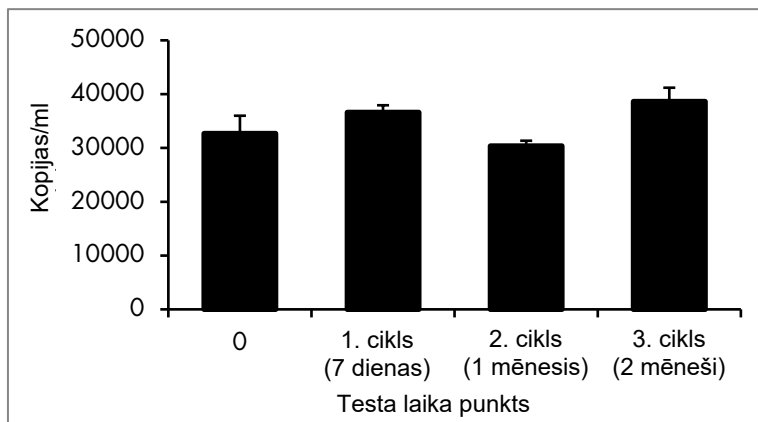
Eluāta stabilitāte

QIASymphony DSP Circulating DNA Kit komplekta eluāta stabilitāte tika novērtēta, izmantojot no cilvēka EDTA plazmas kopparauga ekstrahēto ccfDNA. Eluāti tika glabāti 2 dažādos eluēšanas stabiņu formātos: QIAGEN® EMTR (Elution Microtubes CL 96; kat. Nr. 19588) un 1,5 ml Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock stobriņos. Eluāti tika analizēti 8 atkārtojumos. DNS stabilitāte eluātos tika noteikta ar lokālo real-time PCR analīzi attiecībā uz 18S ribosomas RNS koda sekvenci.

Eluāta stabilitāti 2–8 °C temperatūrā neietekmēja ne glabāšanas perioda ilgums līdz 1 mēnesim, ne glabāšanas formāts (6. attēls). DNS stabilitāti LoBind stobriņos neietekmēja glabāšana no –15 °C līdz –30 °C temperatūrā, kas ietvēra 3 sasaldēšanas–atkausēšanas ciklus pēc 7 dienām, viena mēneša un diviem mēnešiem (7. attēls).



6. attēls. ccfDNA stabilitāte eluātos, kas glabāti 2–8 °C temperatūrā 2 stobriņu formātos. ccfDNA tika ekstrahēta no EDTA plazmas, izmantojot QIASymphony DSP Circulating DNA Kit komplektu, un glabāta 2–8 °C temperatūrā dažādiem testa laika punktiem. ccfDNA iegūtais daudzums tika kvantificēts, izmantojot lokālo real-time PCR analīzi attiecībā uz 18S koda sekvenci. Rezultāti tika aprēķināti kā mērķa kopijas uz mililitru plazmas ievades.



7. attēls. ccfDNA stabilitāte eluātos, kas glabāti no –15 °C līdz –30 °C temperatūrā, iekļaujot 3 sasaldēšanas–atkausēšanas ciklus. ccfDNA tika ekstrahēta no EDTA plazmas, izmantojot QIASymphony DSP Circulating DNA Kit komplektu, un glabāta no –15 °C līdz –30 °C temperatūrā 1,5 ml Eppendorf LoBind stobriņos. ccfDNA iegūtais daudzums tika noteikts 3 testa laika punktos, izmantojot to pašu eluātu 3 sasaldēšanas–atkausēšanas ciklus. ccfDNA iegūtais daudzums tika kvantificēts, izmantojot lokālo real-time PCR analīzi attiecībā uz 18S koda sekvenci. Rezultāti tika aprēķināti kā mērķa kopijas uz mililitru plazmas ievades.

Interferējošas vielas

Cilvēka plazmai un urīnam tika pievienotas dažādas potenciāli interferējošas vielas (skatiet 3. tabulu), lai testētu to ietekmi uz QS DSP Circulating DNA Kit komplekta ccfDNA ekstrahēšanas veiktspēju un turpmāko saderību ar tipiskajām pakārtotajām analīzēm. Eluāti tika analizēti ar lokālo real-time PCR attiecībā uz 18S koda sekvenci un ar Qubit® Fluorometer, izmantojot High Sensitivity dsDNA analīzi.

3. tabula. Potenciāli interferējošu vielu testa koncentrācijas

Interferējošas vielas	Plazma	Urīns
Bilirubīns	200 mg/litrā*	200 mg/litrā*
Hemoglobīns	2 g/litrā ¹	-
BSA un gamma globulīns	Līdz 120 g/litrā*	1 g/litrā [†]
Triglicerīdi	5 g/litrā*	-
Glikoze	10 g/litrā*	10 g/litrā*
Asinis	-	1% [†]
pH	-	pH 4 un pH 9 [†]

* CLSI EP7-A2 Vol. 25 No. 27

[†] FDA Draft Guidance (11.05.2011)

Neviena no 3. tabulā uzskaitītajām vielām neradīja traucējumus, tikai plazmas paraugos ar augstu gamma globulīna koncentrāciju (>30 g/litrā) var samazināties cirkulējošas šūnas nesaturošas DNS atgūšana.

Piezīme. Testēšana tika veikta, izmantojot tipiskus pakārtotos lietojumus ekstrahēto nukleīnskābju kvalitātes novērtēšanai. Taču dažādiem pakārtotajiem lietojumiem var atšķirties prasības attiecībā uz tīrību (t.i., potenciāli interferējošu vielu neesamību), tāpēc pakārtoto lietojumu izstrādes gaitā ir jānosaka arī attiecīgo vielu identificēšana un testēšana ikvienai darbplūsmi, kur iesaistīts QIASymphony DSP Circulating DNA kit komplekts.

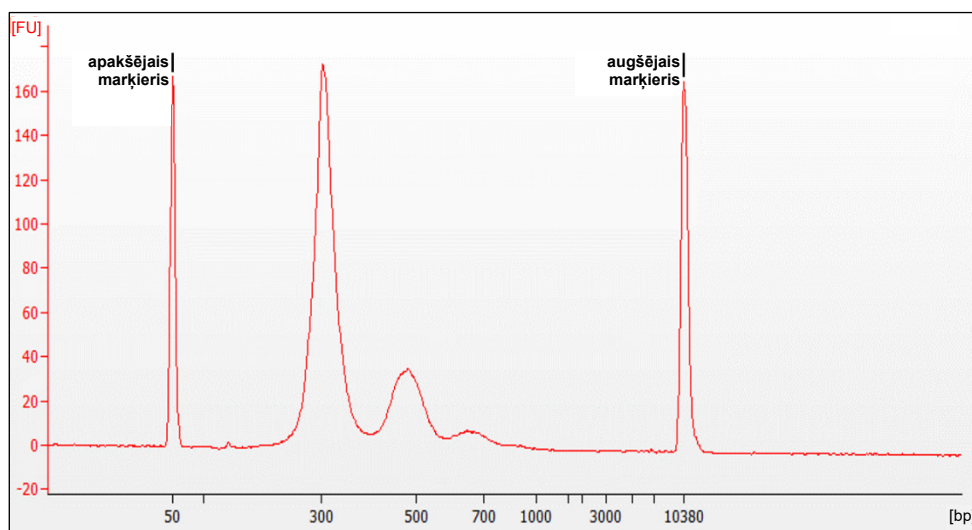
Krusteniskā kontaminācija

QIASymphony DSP Circulating DNA sistēmas krusteniskās kontaminācijas risks tika analizēts, veicot 96 paraugu apstrādes QIASymphony SP instrumentā ar pamīšus partijām šaha galdiņa izkārtojumā (pamīšus pozitīviem un negatīviem paraugiem). Kā parauga materiāli modeļa sistēmai tika izmantoti sievietes plazma (negatīvs paraugs) un sievietes plazma, kam pievienots apcirpts vīrieša gDNA ar SRY1 gēna koncentrāciju $1,0E+05$ kopijas uz mililitru plazmas (pozitīvs paraugs). Paraugi tika sagatavoti, izmantojot 4 ml protokolu, kas ietver divas atsevišķas katra 2 ml parauga pārneses. Negatīvo sievietes plazmas paraugu iespējamā kontaminācija ekstrahēšanas izpilžu laikā tika novērtēta ar secīgu eluātu analīzi, izmantojot real-time PCR attiecībā uz Y hromosomai specifisko gēnu SRY1. Netika konstatēta krusteniskā kontaminācija pārnesē starp paraugiem, starp partijām vai starp izpildēm.

Saderība ar dažādiem pakārtotajiem lietojumiem

QIASymphony DSP Circulating DNA kit komplekta izstrādes laikā tika izmantoti tipiskie pakārtotie lietojumi, lai parādītu, ka izolētās nukleīnskābes ir saderīgas ar plašu klāstu atšķirīgu pakārtoto lietojumu tehnoloģiju, tostarp Real Time-PCR (skatiet 1. attēlu, 2. attēlu, 3. attēlu, 6. attēlu un 7. attēlu), Qubit Fluorometer (proteīna analīzi un ļoti jutīgu dsDNA analīzi), bibliotēku (skatiet 8. attēlu) un jaunākās paaudzes sekvenčēšanu (Next Generation Sequencing, NGS).


















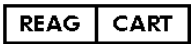
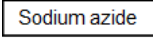
Elektroferogramma 8. attēlā parāda sekmīgas adaptera ligācijas un secīgas ccfDNA amplificēšanas piemēru. Blakus ievērojamajai virsotnei pie 300 bp attiecībā uz nukleosomālo ccfDNA (apm. 165 plus apm. 70 bp katram adapterim) ir redzama arī dinukleosomālā virsotne pie apm. 470 bp.



8. attēls. DNS bibliotēka no ccfDNA (individuāla donora), kas ekstrahēta ar QIASymphony DSP Circulating DNA Kit komplektu. Šī ccfDNA tika ekstrahēta no Streck plazmas, izmantojot 4 ml protokolu, un pēc tam 35 μ l eluāts tika pārcelts NEBNext[®] Ultra DNA Library Prep Kit komplektā (Biolabs). Pēc amplificēšanas un AMPure XP notīrīšanas 1 μ l eluāta tika analizēts ar Agilent 7500 DNA Kit komplektu.

Simboli

Lietošanas instrukcijās vai uz iepakojuma un marķējuma var būt redzami tālāk norādītie simboli.

Simbols	Simbola definīcija
	Satur reaģentus, kuru daudzums ir pietiekams <N> reakcijām
	Izlietot līdz
	Šis produkts atbilst prasībām, ko nosaka Eiropas Regula 2017/746 par in vitro diagnostikas medicīniskajām ierīcēm.
	In vitro diagnostikas medicīniskā ierīce
	Kataloga numurs
	Partijas numurs
	Materiāla numurs (piemēram, komponenta marķējums)
	Komponenti
	Satur
	Numurs
	Globālais tirdzniecības identifikācijas numurs
Rn	R apzīmē lietošanas instrukciju versiju, bet n ir versijas numurs
	Temperatūras ierobežojums
	Ražotājs
	Skatīt lietošanas instrukcijas
	Brīdinājums/uzmanību!
	Proteināze K
	Iedobes numurs (t.i., reaģentu kasetnes iedobe)
	Reaģentu kasetne
	Nātrija azīds

Simbols

Simbola definīcija

EtOH

Etanols

UDI

Unikāls ierīces identifikators

Pārskatījumu vēsture

Versija

Apraksts

R1, 2022. gada jūnijs

Versija 2, pārskatītais izdevums 1

- Atjauninājums versijai 2 par atbilstību IVDR
- Pievienota sadaļa par interferējošām vielām, krustenisko kontamināciju un saderību ar pakārtotajiem lietojumiem.

Jaunāko informāciju par licencēšanu un preču juridiskās atrunas skatiet attiecīgā QIAGEN komplekta rokasgrāmatā vai lietotāja rokasgrāmatā. QIAGEN komplektu rokasgrāmatas un lietotāja rokasgrāmatas ir pieejamas vietnē www.qiagen.com, un tās var pieprasīt arī no QIAGEN tehniskā atbalsta dienesta vai vietējiem preču izplatītājiem.

Preču zīmes: 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 vai tā filiāles). Tiek uzskatīts, ka šajā dokumentā minētie reģistrētie nosaukumi, preču zīmes utt. ir aizsargāti ar likumu pat tad, ja tas nav īpaši norādīts.

HB-3034-D01-001 © 2022 QIAGEN, visas tiesības aizsargātas.

Šī lappuse atstāta tukša ar nolūku.

