



Juni 2022

Petunjuk Penggunaan QIASymphony[®] DSP DNA Kit (Karakteristik Kinerja)

Versi 2



Untuk Penggunaan Diagnostik In Vitro

Untuk digunakan dengan QIASymphony DSP DNA Mini Kit dan QIASymphony DSP DNA Midi Kit



937236, 937255



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Jerman

R1

Karakteristik Kinerja tersedia secara elektronik dan dapat ditemukan pada tab sumber daya dari halaman produk di www.qiagen.com.

Pengenalan Umum

QIAasymphony DSP DNA Kits ditujukan untuk digunakan hanya dengan QIAasymphony SP.

QIAasymphony DSP DNA Mini Kits menyediakan reagen untuk pemurnian yang sepenuhnya otomatis terhadap total DNA dari darah utuh manusia, lapis buffy, jaringan dan jaringan terfiksasi formalin dan tertanam dalam parafin (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE), serta DNA virus dari darah utuh manusia. QIAasymphony DSP DNA Midi Kits menyediakan reagen untuk pemurnian otomatis total DNA dari darah utuh manusia dan lapis buffy. Akan tetapi, karakteristik kinerja untuk setiap tipe jaringan tabung penampung darah belum ditetapkan dan harus divalidasi oleh pengguna.

Teknologi partikel magnetik memungkinkan pemurnian asam nukleat berkualitas tinggi yang bebas protein, nuklease, dan kotoran lain. Asam nukleat yang dimurnikan siap untuk digunakan langsung dalam aplikasi downstream, seperti reaksi amplifikasi (PCR). QIAasymphony SP melakukan semua langkah pada prosedur pemurnian. Hingga 96 sampel, dalam batch sebanyak hingga 24, diproses dalam satu proses.

Dalam kinerja yang dipilih berikut, ditampilkan data untuk berbagai aplikasi.

Karakteristik Kinerja

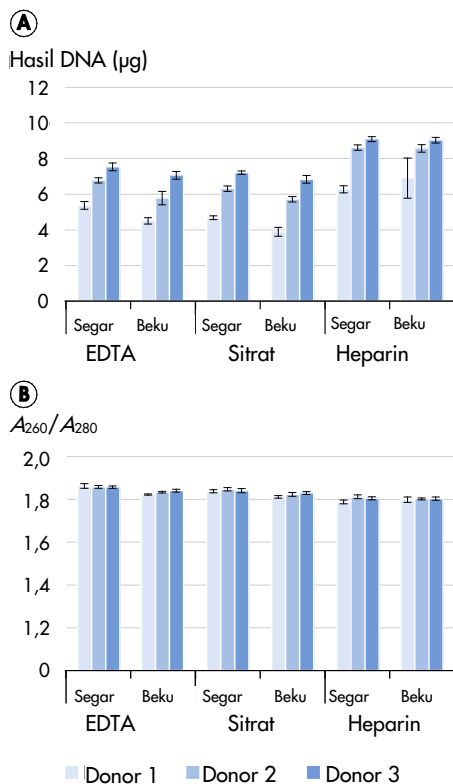
Catatan: Karakteristik Kinerja sangat bergantung pada berbagai faktor dan berkaitan dengan aplikasi downstream tertentu. Ini telah ditetapkan untuk QIAAsymphony DSP DNA Mini dan Midi Kits sehubungan dengan aplikasi downstream contoh. Akan tetapi, metode untuk mengisolasi asam nukleat dari spesimen biologis digunakan sebagai awal untuk beberapa aplikasi downstream. Parameter kinerja seperti kontaminasi silang atau presisi proses perlu ditetapkan untuk alur kerja mana pun tersebut sebagai bagian dari pengembangan aplikasi downstream. Oleh karena itu, merupakan tanggung jawab pengguna untuk memvalidasi keseluruhan alur kerja untuk menetapkan parameter kinerja yang sesuai.

Kinerja dasar dan kompatibilitas dengan aplikasi downstream lain

Darah DNA dan lapis buffy

Hasil DNA

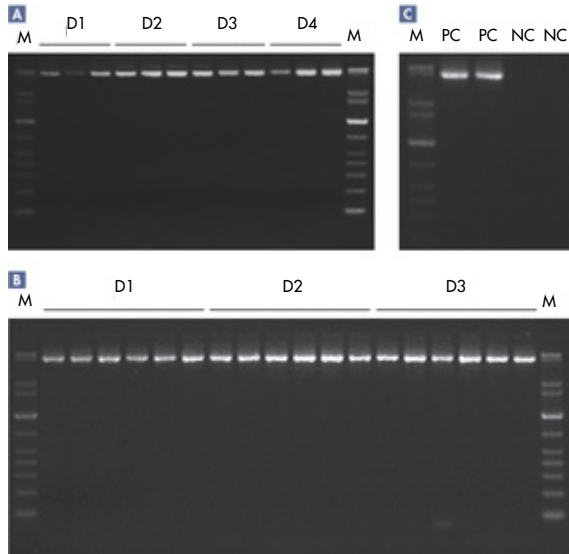
Kinerja dasar QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit dievaluasi menggunakan tabung penampung dan antikoagulan yang berbeda, serta darah utuh manusia yang segar dan beku. Darah utuh ditampung dari 3 donor sehat (jumlah sel darah putih (white blood cell, WBC) 4,0 hingga $11,0 \times 10^6$ sel/ml) dalam 3 tipe tabung yang berbeda: EDTA, 10 ml BD™ Vacutainer® 16 x 100 mm (K2-EDTA); sitrat, Tabung 2,7 ml Sarstedt® S-Monovette® 9NC 13 x 75 mm (sitrat); heparin, 7,5 ml Sarstedt S-Monovette 15 x 92 mm (Li-Heparin). Darah digunakan baik segar (disimpan pada suhu 2–8 °C) atau beku (disimpan pada suhu -20 °C). DNA genomik dimurnikan dari 200 µl sampel, dengan 4 replikat per donor dan tipe tabung, menggunakan QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit dan protokol blood 200 DSP dengan volume elusi sebesar 200 µl. Kemurnian dan hasil DNA ditentukan dengan analisis spektroskopis (Gambar 1).



Gambar 1. Kemurnian dan hasil DNA yang menggunakan antikoagulan dan tabung penampung sampel yang berbeda dengan darah utuh manusia segar dan beku. A Hasil DNA, bar menunjukkan hasil DNA mutlak dengan simpangan baku. **B** Kemurnian DNA, bar menunjukkan kemurnian DNA dengan simpangan baku.

Integritas DNA

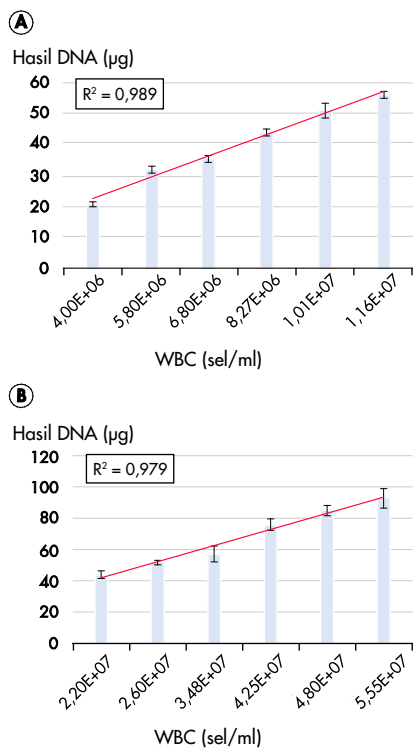
Produk PCR rentang panjang (long-range) (5 kb) diamplifikasi menggunakan uji kadar PCR LongRange (Gambar 2).



Gambar 2. Integritas DNA yang diuji dengan PCR rentang-panjang. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder. **A** Darah utuh ditampung dari 4 donor sehat (D) dalam tabung BD K2E. DNA genomik untuk PCR rentang panjang dimurnikan dari 200 μ l alikuot dalam triplikate, menggunakan QIASymphony DSP DNA Mini Kit dan protokol DSP darah 200 dengan volume elusi sebesar 200 μ l. D1, donor 1; D2, donor 2; D3, donor 3; dan D4, donor 4. **B** Darah utuh ditampung dari 3 donor sehat dalam tabung BD K2E, dan lapis buffy disiapkan. DNA genomik dimurnikan dari 200 μ l alikuot dalam 6 replikat menggunakan QIASymphony DSP DNA Mini Kit dan protokol buffy coat 200 DSP dengan volume elusi sebesar 200 μ l. D1, donor 1; D2, donor 2; dan D3, donor 3. **C** Kontrol (Controls): PC, kontrol positif (positive control); dan NC, kontrol negatif (negative control).

Korelasi hasil DNA terhadap jumlah WBC

Kinerja untuk aplikasi QIASymphony DSP DNA Blood dan buffy coat dievaluasi menggunakan sampel darah dan lapis buffy dengan 6 jumlah WBC yang berbeda untuk masing-masing tipe sampel. Untuk darah utuh, jumlah WBC berkisar mulai 4×10^6 sel/ml hingga $11,6 \times 10^6$ sel/ml, dan untuk lapis buffy, hitungan berkisar mulai $2,2 \times 10^7$ sel/ml hingga $5,6 \times 10^7$ sel/ml. Hasil DNA ditentukan oleh analisis spektroskopis dan diplot terhadap jumlah WBC (Gambar 3).



Gambar 3. Korelasi hasil DNA terhadap jumlah WBC. **A** DNA genomik dimurnikan dari 1 ml darah utuh manusia menggunakan QIAasympphony DSP DNA Midi Kit dan protokol blood 1000 DSP dengan volume elusi sebesar 500 µl. Bar menunjukkan hasil DNA mutlak dengan simpangan baku. **B** DNA genomik dimurnikan dari 400 µl lapis buffy menggunakan QIAasympphony DSP DNA Midi Kit dan protokol buffy coat 400 DSP dengan volume elusi sebesar 400 µl. Bar menunjukkan hasil DNA mutlak dengan simpangan baku.

Darah virus

Studi angka kena dilakukan dengan mengencerkan materi standar CMV WHO yang dihitung sebelumnya dalam darah utuh manusia CMV-negatif. Tingkat deteksi 100% diamati untuk sampel dengan muatan virus sebesar 90 IU CMV per mililiter (Tabel 1).

Tabel 1. Sensitivitas aplikasi QIAasympphony DSP Virus Blood

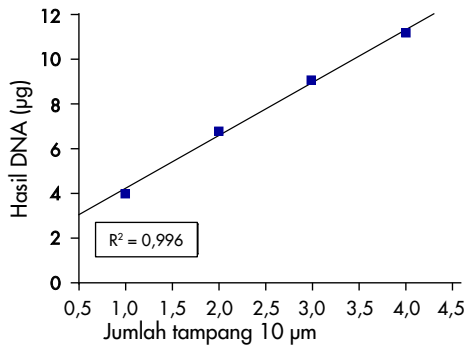
CMV (IU/ml)	Replikasi	Angka kena	Angka kena (%)
350	18	18	100,00
230	32	32	100,00
115	31	31	100,00
90	32	32	100,00
60	30	24	80,00
30	30	15	50,00
15	30	10	33,33
6	21	5	23,81
2	21	2	9,52
0	15	0	0,00

Darah utuh manusia ditampung dari 1 donor CMV-negatif yang sehat dalam tabung BD K2E dan dibubuhi dengan materi standar CMV WHO menggunakan titer yang berbeda. DNA Virus dimurnikan menggunakan QIAasympphony DSP DNA Mini Kit dan protokol DSP darah virus 200 dengan volume elusi sebesar 60 µl. Eluat dianalisis dengan uji kadar real-time PCR CMV.

Jaringan dan jaringan FFPE

Hasil DNA

Kinerja untuk aplikasi jaringan QIASymphony DSP DNA FFPE dievaluasi menggunakan 6 replikat dari tampang FFPE 1–4, 10 µm, dari limpa manusia yang baru saja dipotong. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan QIASymphony DSP DNA Mini Kit dengan protokol DSP kandungan rendah jaringan. Deparafinisasi dan lisis dilakukan menggunakan metode pretreatment xilena/etanol. DNA dielusi dalam dapar elusi 50 µl, dan hasil DNA ditentukan dengan analisis spektroskopis (Gambar 4).



Gambar 4. Korelasi hasil DNA terhadap jumlah tampang jaringan FFPE. Enam replikat tampang jaringan FFPE 1–4, 10 µm, dari limpa manusia dideparafinisasi dengan pretreatment xilena/etanol. Ekstraksi DNA dilakukan di QIASymphony SP menggunakan QIASymphony DSP DNA Mini Kit dengan protokol DSP kandungan rendah jaringan dan volume elusi sebesar 50 µl.

Analisis status mutasi biomarker dengan real-time PCR

Analisis status mutasi biomarker dilakukan menggunakan DNA yang diekstrak dari tampang FFPE usus manusia dan DNA yang diekstrak dari sampel jaringan paru manusia.

Untuk ekstraksi DNA dari sampel jaringan FFPE, 3 x 10 µm tampang usus manusia digunakan untuk penyiapan sampel. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan Deparaffinization Solution untuk pretreatment dan protokol DSP kandungan rendah jaringan dengan volume elusi sebesar 100 µl. Analisis mutasi KRAS biomarker dilakukan menggunakan uji kadar real-time PCR untuk deteksi KRAS sesuai dengan buku pegangan uji kadar. Nilai C_T uji kadar kontrol berada dalam rentang yang ditetapkan, dan analisis mutasi terdeteksi mengungkapkan pengganti asam amino dalam kodon 12 yang ditunjukkan dengan nilai ΔC_T sebesar 4,17, yang mana berada di bawah nilai batas yang ditetapkan sebesar 8 untuk deteksi mutasi 12SER (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil analisis mutasi biomarker KRAS jaringan FFPE

Sampel	Reaksi	C _T Target	C _T Kontrol internal	ΔC _T *
Kontrol tanpa templat	Kontrol	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	-
Standar	Kontrol	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
Jaringan FFPE (usus manusia)	Kontrol	24,94	31,98	-
	12ALA	t.t.	32,42	-
	12ASP	t.t.	32,73	-
	12ARG	t.t.	33,05	-
	12CYS	t.t.	32,74	-
	12SER	29,11	32,34	4,17
	12VAL	t.t.	32,81	-
	13ASP	t.t.	33,20	-

* $\Delta C_T = M C_T - C C_T$, di mana M berarti mutasi dan C berarti kontrol; t.t., tidak terdeteksi.

Untuk ekstraksi DNA dari sampel jaringan beku, sebanyak 25 mg jaringan paru manusia digunakan untuk penyiapan sampel menggunakan protokol DSP kandungan tinggi jaringan dan volume elusi sebesar 200 μ l. Analisis mutasi biomarker EGFR dilakukan menggunakan uji kadar real-time PCR untuk EGFR. Analisis deteksi mutasi dan kontrol dilakukan seperti yang dijelaskan dalam buku pegangan uji kadar. Hasil mengungkapkan penghapusan dalam gen EGFR, seperti yang ditunjukkan oleh nilai ΔC_T sebesar 2,47, yang mana berada di bawah nilai batas yang ditetapkan sebesar 12 untuk deteksi suatu mutasi (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil analisis mutasi biomarker EGFR jaringan beku

Sampel	Reaksi	C _T Target	C _T Kontrol internal	ΔC _T *
Kontrol tanpa templat	Kontrol	0,00	31,71	-
	T790M	0,00	32,36	-
	Penghapusan	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	-
Standar	Kontrol	28,78	31,05	-
	T790M	30,08	31,13	1,30
	Penghapusan	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
Jaringan (paru manusia)	Kontrol	25,76	31,23	-
	T790M	t.t.	31,99	-
	Penghapusan	28,23	30,99	2,47
	L858R	t.t.	31,33	-
	L861Q	t.t.	31,98	-
	G719X	t.t.	32,06	-
	S768I	t.t.	31,88	-
	Ins	t.t.	31,62	-

* $\Delta C_T = M C_T - C C_T$, di mana M berarti mutasi dan C berarti kontrol; t.t., tidak terdeteksi.

Pengulangan dan reproduksibilitas

Darah DNA

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan protokol blood 200 DSP dengan volume elusi sebesar 200 µl. Keterulangan dievaluasi oleh satu operator yang melakukan 3 proses independen (masing-masing 96 sampel) di 3 hari yang berbeda, dengan setiap prosesnya terdiri dari 4 batch berisi 24 sampel (Tabel 4 dan Tabel 5).

Reproduksibilitas dievaluasi dengan melakukan 3 proses independen (masing-masing 96 sampel) di 3 hari yang berbeda, oleh 3 operator yang berbeda pada instrumen QIASymphony SP yang berbeda, dengan setiap prosesnya terdiri dari 4 batch berisi 24 sampel (Tabel 6 dan Tabel 7).

Tabel 4. Hasil evaluasi keterulangan

Proses	Batch	n	Rata-rata hasil DNA (µg)	SB	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
Total	-	288	4,96	-	-

n, Jumlah replikat; SB, simpangan baku; CV, koefisien variasi.

Tabel 5. Data presisi untuk evaluasi keterulangan

	SB	CV
Batch ke batch dalam proses yang sama	0,25	4,95
Keseluruhan akurasi repetisi	0,26	5,18

SB, simpangan baku; CV, koefisien variasi.

Tabel 6. Hasil evaluasi reproduksibilitas

Proses	Batch	n	Rata-rata hasil DNA (µg)	SB	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
Total	-	288	5,38	-	-

n, Jumlah replikat; SB, simpangan baku; CV, koefisien variasi.

Tabel 7. Data presisi untuk evaluasi reproduksibilitas

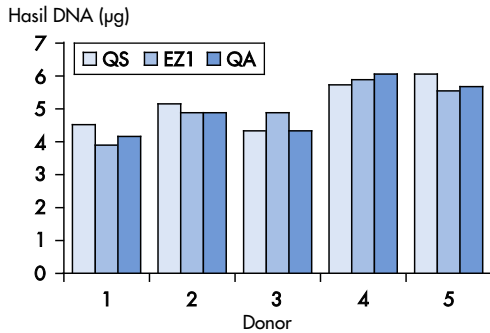
	SB	CV
Batch ke batch dalam proses yang sama	0,25	4,73
Keseluruhan akurasi repetisi	0,38	7,03

SB, simpangan baku; CV, koefisien variasi.

Kinerja perbandingan

Darah DNA

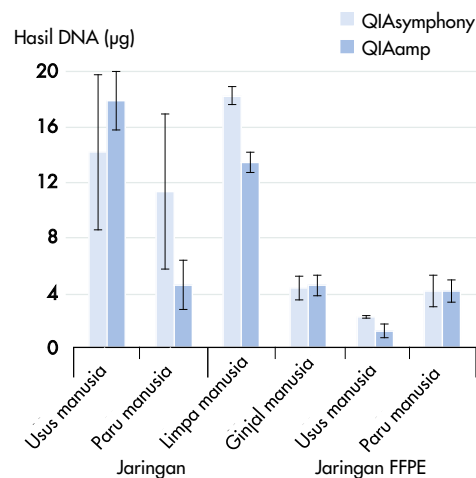
Kinerja dianalisis untuk sistem QIAasymphony DSP DNA blood dibandingkan terhadap sistem EZ1® DSP DNA blood dan prosedur penyiapan manual QIAamp® DNA Blood Mini Kit. DNA dimurnikan dari sampel darah yang berbeda, dianalisis untuk hasil DNA (Gambar 5).



Gambar 5. Perbandingan hasil DNA antara sistem pemurnian DNA darah yang berbeda. Darah utuh ditampung dari 5 donor sehat dalam tabung BD K2E. Untuk semua metode, digunakan volume input sampel 200 µl dan volume elusi sebesar 200 µl. QS, QIAasymphony DSP DNA Mini Kit dan protokol blood 200 DSP; EZ1, EZ1 Advanced XL menggunakan EZ1 DSP DNA Blood Kit; QA, QIAamp DNA Blood Mini Kit. Bar menunjukkan hasil DNA mutlak untuk masing-masing sampel.

Jaringan dan jaringan FFPE

Kinerja QIAasymphony DSP DNA Mini Kit was dibandingkan terhadap kinerja QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit manual dan QIAamp DSP DNA Mini Kit menggunakan jaringan FFPE serta jaringan segar dan beku, masing-masingnya, sebagai materi sampel. Penyiapan sampel manual dan otomatis, serta kuantifikasi hasil DNA, dilakukan secara bersamaan. Hasil DNA setelah ekstraksi dari sampel jaringan FFPE dan segar/beku menggunakan QIAasymphony DSP DNA Mini Kit, QIAamp DSP DNA Mini Kit, (jaringan) dan QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (jaringan FFPE) ditunjukkan dalam Gambar 6.



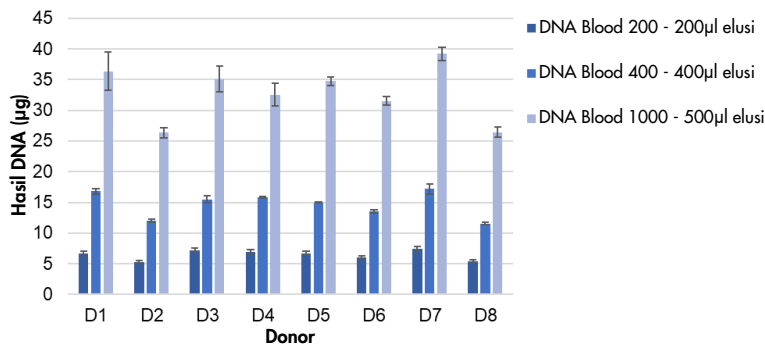
Gambar 6. Ekstraksi DNA dari sampel jaringan dan jaringan FFPE. Untuk jaringan segar/beku, sampel paru dan usus manusia dipotong menjadi 6 x 25 mg potong. Tiga potong dari masing-masing tipe jaringan digunakan untuk penyiapan sampel menggunakan QIAasymphony SP dengan protokol DSP kandungan tinggi jaringan. Ekstraksi DNA dari sampel yang tersisa dilakukan menggunakan QIAamp DSP DNA Mini Kit. DNA dielusi dalam 200 µl, dan hasil DNA ditentukan dengan analisis spektroskopis. Untuk ekstraksi DNA dari jaringan FFPE, 12 replikat yang berisi 3 x 10 µm tampang jaringan FFPE dari berbagai organ manusia disiapkan. Enam sampel digunakan untuk penyiapan sampel menggunakan QIAasymphony SP dengan pretreatment Deparaffinization Solution dan protokol DSP kandungan rendah jaringan. Ekstraksi DNA dari sampel yang tersisa dilakukan menggunakan QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. DNA dielusi dalam 50 µl, dan hasil DNA ditentukan dengan analisis spektroskopis. Bar menunjukkan hasil DNA mutlak dengan simpangan baku.

Rentang input sampel/output eluat

Darah DNA

Rentang input sampel dan output eluat yang berbeda untuk aplikasi darah DNA dibandingkan menggunakan sampel dari donor darah dengan rentang jumlah WBC mulai $5,0$ hingga $8,0 \times 10^6$ sel/ml.

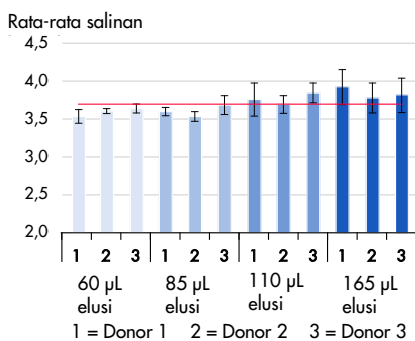
Darah utuh ditampung dari 8 donor sehat dalam tabung BD K2E. DNA dimurnikan dari 6 replikat, masing-masing menggunakan QIAasymphony DSP DNA Mini/Midi Kit dan protokol DNA blood 200 DSP dengan volume $200 \mu\text{l}$, protokol DNA blood 400 DSP dengan volume elusi $400 \mu\text{l}$ dan protokol DNA blood 1000 DSP dengan volume elusi $500 \mu\text{l}$ (Gambar 7).



Gambar 7. Perbandingan volume input sampel dan elusi yang berbeda untuk sistem pemurnian DNA darah. Darah utuh ditampung dari 8 donor sehat dalam tabung BD K2E. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan protokol DNA blood 200 dengan volume elusi $200 \mu\text{l}$, protokol DNA blood 400 dengan volume elusi $400 \mu\text{l}$, dan protokol DNA blood 1000 dengan volume elusi $500 \mu\text{l}$. Hasil DNA ditentukan dengan analisis spektroskopis. Bar menunjukkan hasil DNA mutlak (nilai rata-rata dengan simpangan baku) untuk masing-masing donor.

Darah virus

Darah utuh ditampung dari 3 donor sehat, dengan jumlah WBC berkisar mulai $4,0$ hingga $11,0 \times 10^6$ sel/ml, dalam tabung BD K2E dan dibubuhi dengan materi standar CMV (titer $3,7$ salinan log/ml). DNA virus dimurnikan dari 7 replikat, masing-masing menggunakan QIAasymphony DSP DNA Mini Kit dan protokol DSP darah virus 200 dengan 4 volume elusi yang berbeda (Gambar 8).



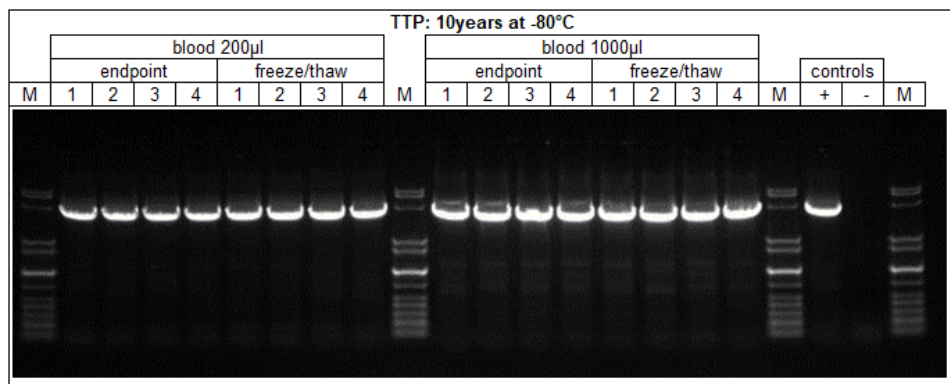
Gambar 8. Perbandingan kuantifikasi DNA virus untuk volume elusi yang berbeda. Eluat dari masing-masing sampel donor dan volume elusi (60 , 85 , 110 , dan $165 \mu\text{l}$) dianalisis dengan uji kadar real-time PCR CMV. Garis merah mewakili titer target dan bar menunjukkan rata-rata salinan log per mililiter dengan simpangan baku.

Stabilitas eluat

Catatan: Stabilitas eluat sangat bergantung pada berbagai faktor dan berkaitan dengan aplikasi downstream tertentu. Ini telah ditetapkan untuk QIA Symphony DSP Mini dan Midi Kit sehubungan dengan aplikasi downstream contoh. Merupakan tanggung jawab pengguna untuk membaca petunjuk penggunaan aplikasi downstream tertentu yang digunakan dalam laboratorium dan/atau memvalidasi keseluruhan alur kerja untuk menciptakan kondisi penyimpanan yang sesuai.

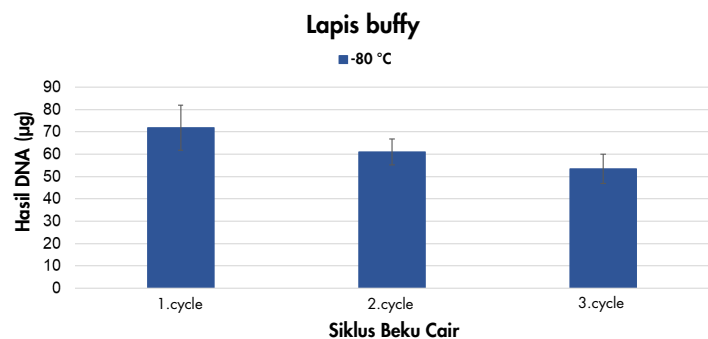
Darah DNA dan lapis buffy

Stabilitas eluat untuk aplikasi darah DNA diuji menggunakan eluat untuk proses QS yang dilakukan dengan protokol DNA Blood 200 dengan volume elusi 200 µl dan dengan protokol DNA Blood 1000 dengan volume elusi 500 µl. Eluat disimpan dalam 2ml Sarstedt Tubes pada suhu ruang, 2–8 °C, -20 °C, dan -80 °C. Kemurnian dan hasil DNA ditentukan dengan analisis spektroskopis. Integritas DNA dianalisis dengan elektroforesis gel dan uji kadar PCR LongRange (Gambar 9).



Gambar 9. Stabilitas eluat untuk darah DNA. DNA dimurnikan menggunakan protokol DNA Blood 200 µl dan 1000 µl. Eluat telah disimpan pada suhu -80 °C dalam Tabung Sarstedt 2 ml. Empat replikat dianalisis. Integritas DNA diuji dengan PCR rentang-panjang. Gambar menunjukkan hasil setelah penyimpanan selama 10 tahun. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder.

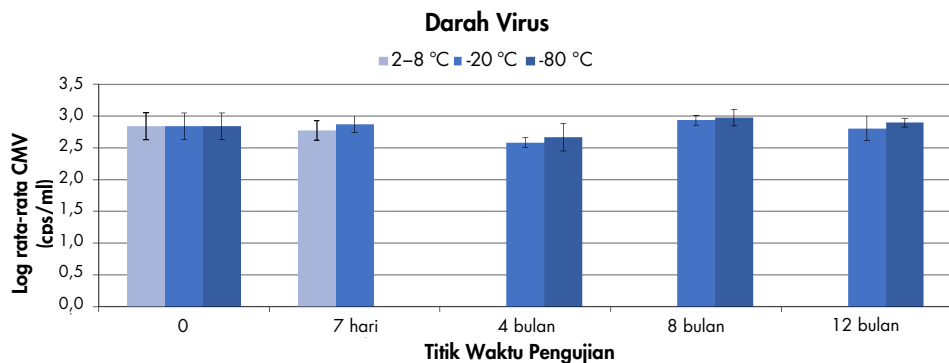
Stabilitas eluat untuk aplikasi lapis buffy diuji menggunakan eluat dari proses QS yang dilakukan dengan protokol BC 400 µl dan volume elusi 200 µl. Eluat disimpan dalam Tabung Sarstedt 2 ml dan Rak Tabung Mikro Elusi pada suhu ruang, 2–8 °C, -20 °C, dan -80 °C. Selain itu, eluat mengalami pengujian beku/cair selama maksimum 3 siklus (Gambar 10). Kemurnian dan hasil DNA ditentukan dengan analisis spektroskopis. Integritas DNA dianalisis dengan elektroforesis gel dan uji kadar PCR LongRange (50 µl reaksi).



Gambar 10. Siklus beku/cair eluat untuk lapis buffy. DNA dimurnikan menggunakan protokol DNA BC 400 µl. Lapis buffy dihasilkan dari darah EDTA. Eluat telah disimpan dalam Tabung Sarstedt 2 ml. Hasil DNA ditentukan pada titik waktu pengujian menggunakan eluat yang sama pada 3 siklus beku/cair. Hasil DNA ditentukan dengan analisis spektroskopis. Bar menunjukkan hasil DNA mutlak (nilai rata-rata dengan simpangan baku).

Darah virus

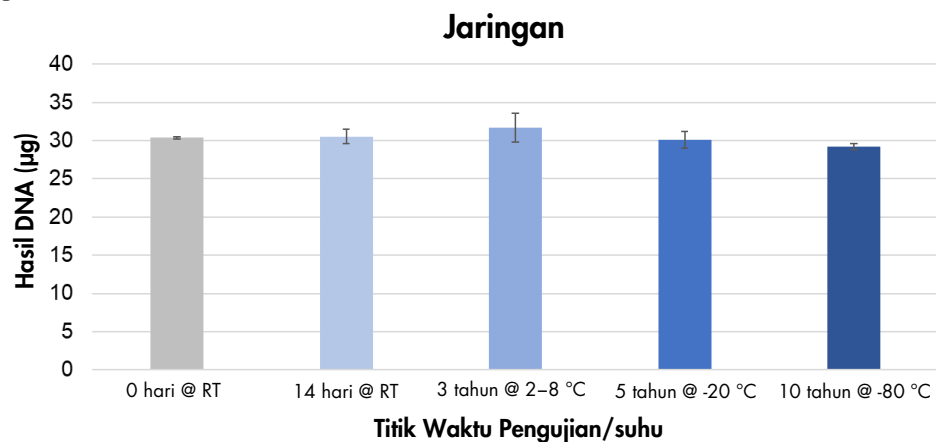
Stabilitas eluat untuk aplikasi darah virus diuji menggunakan eluat dari proses QS yang dilakukan dengan protokol Virus Blood 200 dengan volume elusi 60 µl. Darah EDTA K₂ yang dibubuhi dengan standar CMV komersial (titer 2,7 salinan log/ml) digunakan sebagai materi sampel. Eluat disimpan dalam Tabung Sarstedt 2 ml pada suhu 2–8 °C, -20 °C, dan -80 °C. Eluat dianalisis menggunakan uji kadar real time CMV (Gambar 11). Berikut ini adalah hasil beberapa titik waktu pengujian.



Gambar 11. Stabilitas eluat untuk aplikasi darah virus. Sampel darah EDTA yang dibubuhi dengan standar CMV komersial dimurnikan dengan protokol Virus Blood 200. Eluat telah disimpan di beberapa suhu dalam rak tabung Mikro Elusi dan Tabung Sarstedt 2 ml. Berdasarkan Titik waktu pengujian, 4 replikat dianalisis. Bar menunjukkan titer CMV (nilai rata-rata log dengan simpangan baku).

Jaringan

Stabilitas eluat untuk aplikasi jaringan diuji menggunakan protokol Tissue HC 200 µl dan volume elusi 200 µl. Hati bovin segar digunakan sebagai materi sampel. Eluat disimpan dalam Tabung Sarstedt 2 ml dan Rak Tabung Mikro Elusi pada suhu ruang, 2–8 °C, -20 °C, dan -80 °C. Kemurnian dan hasil DNA ditentukan dengan analisis spektroskopis (Gambar 12). Integritas DNA dianalisis dengan elektroforesis gel.

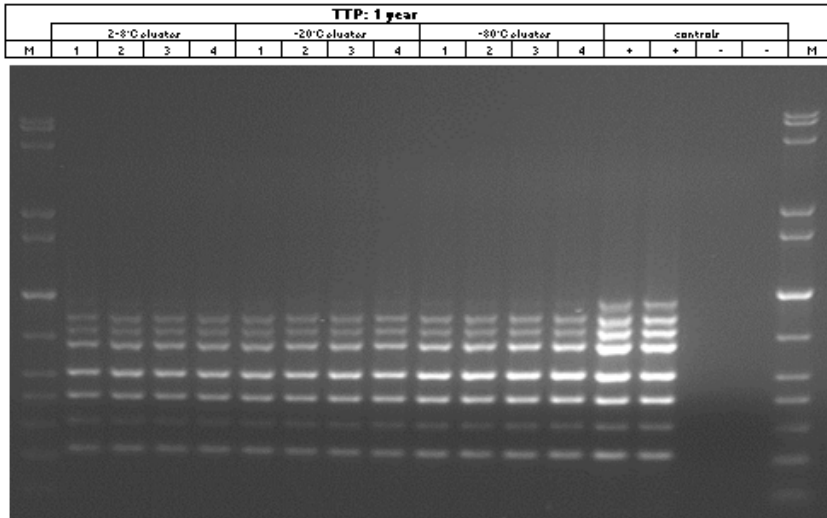


Gambar 12. Stabilitas eluat untuk jaringan. DNA dimurnikan protokol DNA Tissue HC dengan volume elusi 200 µl. Hati bovin segar digunakan sebagai materi sampel. Eluat telah disimpan di beberapa suhu dalam rak tabung Mikro Elusi dan Tabung Sarstedt 2 ml. Berdasarkan titik waktu pengujian, 4 replikat dianalisis. Hasil DNA ditentukan dengan analisis spektroskopis. Bar menunjukkan hasil DNA mutlak (nilai rata-rata dengan simpangan baku).

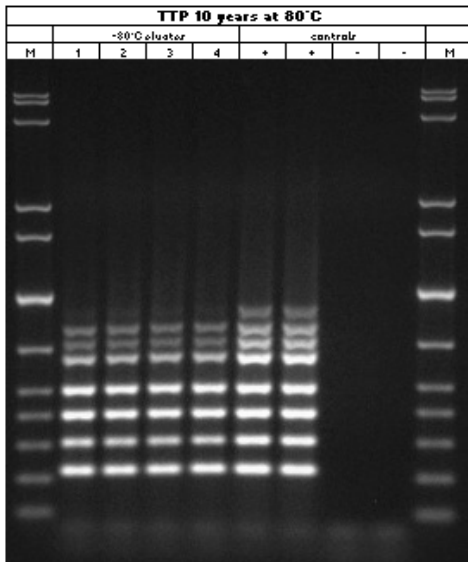
Jaringan FFPE

Stabilitas eluat untuk aplikasi jaringan FFPE diuji menggunakan protokol Tissue LC 200 µl dan volume elusi 100 µl. Jaringan FFPE manusia komersial digunakan sebagai materi sampel. Eluat disimpan dalam Tabung Sarstedt 2 ml dan Rak Tabung Mikro Elusi pada suhu ruang, 2–8 °C, -20 °C, dan -80 °C. Eluat dianalisis dengan uji kadar Inhouse human 8-plex PCR (Gambar 13). Berikut ini adalah hasil dua titik waktu pengujian.

A:



B:



Gambar 13. Stabilitas eluat untuk jaringan FFPE. DNA dimurnikan menggunakan protokol DNA Tissue LC. Jaringan FFPE komersial digunakan sebagai materi sampel. Eluat telah disimpan di beberapa suhu dalam rak tabung Mikro Elusi dan Tabung Sarstedt 2 ml. Berdasarkan titik waktu pengujian, 4 replikat dianalisis. Eluat dianalisis dengan uji kadar Inhouse human 8-plex PCR.

Zat yang mengganggu

Pengaruh zat yang menghambat, yang mungkin ada dalam darah utuh, pada kinerja aplikasi darah DNA, aplikasi darah virus, dan aplikasi jaringan diuji dengan penambahan zat-zat berikut:

Tabel 8. Potensi zat yang mengganggu yang diuji untuk berbagai aplikasi

Zat yang mengganggu	Konsentrasi	Darah	Darah virus	Jaringan
Bilirubin	200 mg/L	√	√	√
Hemoglobin	200 g/L	√	√	
Trigliserida	30 g/L	√	√	√
Protein	120 g/L	√	√	√

Catatan: "√" menunjukkan materi sampel mana yang diuji untuk potensi zat yang mengganggu terkait.

Untuk hemoglobin (200 g/l) dan protein (120 g/l), level yang sudah ada dalam sampel darah ditentukan dan hemoglobin atau protein lain ditambahkan untuk mencapai konsentrasi yang ditunjukkan, masing-masing 200 atau 120 g/l. Untuk bilirubin (200 mg/l) dan trigliserida(30 g/l), total jumlah masing-masing zat ditambahkan ke sampel untuk mencapai konsentrasi yang ditunjukkan.

Untuk jaringan, total jumlah masing-masing zat ditambahkan secara langsung pada lisat, tanpa penentuan untuk konsentrasi bilirubin, trigliserida, atau protein dari sampel jaringan yang digunakan.

Setiap potensi zat yang mengganggu (misalnya, obat-obatan) dan konsentrasi terkait bersifat sangat spesifik terhadap aplikasi downstream dan kemungkinan perawatan medis sebelumnya pada pasien sehingga perlu diperiksa selama verifikasi aplikasi downstream tersebut menggunakan QIASymphony DSP DNA Mini dan Midi Kits.

Catatan: Pengujian dilakukan menggunakan aplikasi downstream contoh untuk penilaian kualitas asam nukleat yang diekstrak. Akan tetapi, aplikasi downstream lain mungkin memiliki persyaratan lain sehubungan dengan pemurnian (yakni, tidak adanya atau konsentrasi potensi zat yang mengganggu), sehingga identifikasi dan pengujian zat terkait dan konsentrasi terkait juga perlu ditetapkan sebagai bagian dari bagian pengembangan aplikasi downstream untuk setiap alur kerja yang melibatkan QIASymphony DSP Mini dan Midi Kits.

Catatan: Perlu diperhatikan bahwa selama pengembangan QIASymphony DSP DNA Midi Kit, tidak ditemukan adanya indikasi bahwa heparin berdampak negatif terhadap kinerja. Akan tetapi, ISO 20186-2:2019(E) menyatakan bahwa heparin dari tabung penampung darah dapat berdampak pada pemurnian asam nukleat yang terisolasi dan kemungkinan limpahan ke dalam eluat dapat menyebabkan inhibisi dalam beberapa aplikasi downstream. Oleh karena itu, merupakan tanggung jawab pengguna untuk memvalidasi apakah heparin memiliki pengaruh negatif pada alur kerjanya.

Darah DNA dan lapis buffy

Untuk aplikasi darah DNA, pengujian dilakukan menggunakan protokol DSP DNA 1000, yang mencakup volume input sampel tertinggi, menggunakan volume elusi 200 dan 500 µl.

Eluat dianalisis dengan analisis spektroskopis untuk kemurnian dan hasil DNA. Kompatibilitas PCR diuji dengan real-time PCR serta uji kadar PCR titik akhir.

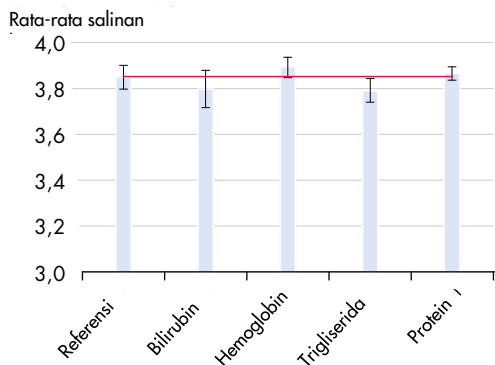
Tidak satu pun zat yang tercantum dalam Tabel 9 yang mengganggu; akan tetapi, sampel dengan konsentrasi trigliserida yang tinggi (>30 g/l) dapat menyebabkan penurunan hasil gDNA.

Darah virus

Untuk aplikasi darah virus, pengujian dilakukan menggunakan protokol DSP Virus Blood 200 dengan volume elusi 60 µl. Sampel darah CMV-negatif dibubuhi dengan 500 salinan/ml (konsentrasi rendah) dan sebuah 1×10^4 salinan/ml (konsentrasi tinggi, Gambar 14) standar CMV komersial.

Eluat dianalisis dengan uji kadar Real-time PCR CMV.

Tidak satu pun zat yang tercantum dalam Tabel 9 yang mengganggu; akan tetapi, sampel dengan konsentrasi trigliserida yang tinggi (>30 g/l) dapat menyebabkan penurunan pemurnian DNA virus.



Gambar 14. Pengujian zat penghambat. Darah utuh ditampung dari 1 donor sehat dalam tabung BD K2E dan dibubuhi dengan materi standar CMV (titer 4,0 salinan log/ml). Lima sampel diuji dengan menambahkan inhibitor potensial, dan DNA virus dimurnikan dari 4 replikat masing-masing sampel menggunakan QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit dan protokol DSP darah virus 200 dengan volume elusi sebesar 165 µl. Eluat dianalisis dengan uji kadar real-time PCR CMV. Garis merah mewakili titer yang ditentukan untuk sampel referensi, yang tidak dibubuhi zat penghambat apa pun, dan bar menunjukkan rata-rata salinan log per mililiter dengan simpangan baku.

Jaringan

Untuk jaringan DNA (segar dan beku), pengujian dilakukan menggunakan protokol DSP DNA HC, dengan volume elusi 200 µl.

Eluat dianalisis dengan analisis spektroskopis untuk kemurnian dan hasil DNA. Kompatibilitas PCR diuji dengan uji kadar real-time PCR.

Tidak satu pun zat yang tercantum dalam Tabel 9 teridentifikasi memiliki dampak negatif terhadap penyiapan sampel.

Jaringan FFPE

Untuk jaringan FFPE, pengujian dilakukan menggunakan protokol DSP DNA LC, dengan volume elusi 50 µl.

Zat-zat (lihat Tabel 9) ditambahkan secara langsung pada lisat.

Tabel 9. Potensi zat yang mengganggu yang diuji untuk berbagai aplikasi

Zat yang mengganggu	Konsentrasi dalam lisat
Xilena	Hingga 11%
Etanol	Hingga 11%
Larutan deparafinisasi (Deparaffinization solution)	Hingga 11%
Parafin	Tampang 0,1 µM

Eluat dianalisis dengan analisis spektroskopis untuk kemurnian dan hasil DNA. Kompatibilitas PCR diuji dengan real-time PCR serta uji kadar Inhouse human 8-plex PCR.

Tidak satu pun zat yang tercantum dalam Tabel 9 teridentifikasi memiliki dampak negatif terhadap penyiapan sampel.

Kontaminasi silang





Darah DNA

Risiko kontaminasi silang aplikasi QIASymphony DNA Blood dianalisis dengan melakukan empat 96 proses sampel pada instrumen QIASymphony SP dengan batch kotak-kotak bergantian (sampel positif dan negatif secara bergantian), yang diinterupsi dengan batch yang benar-benar negatif. Darah pria (mengandung jumlah WBC sebanyak $\geq 1,0 \times 10^7$ sel/ml dan darah wanita yang mengandung jumlah WBC antara $4,0 \times 10^6$ dan 9×10^6 sel/ml) digunakan sebagai sistem model. Penyiapan sampel dilakukan menggunakan protokol blood 1000 µl, yang mencakup volume sampel tertinggi. Potensi kontaminasi sampel wanita negatif selama proses ekstraksi dievaluasi dengan analisis berikutnya pada eluat menggunakan uji kadar real-time PCR untuk kromosom Y.

Tidak terdeteksi adanya kontaminasi silang untuk limpahan sampel-ke-sampel, atau batch-ke-batch, atau proses-ke-proses.

Simbol

Simbol berikut muncul dalam dokumen ini. Untuk daftar lengkap simbol-simbol yang digunakan dalam petunjuk penggunaan atau pada kemasan dan label, silakan lihat buku pegangan.

Simbol	Definisi simbol
	Produk ini memenuhi persyaratan Peraturan Eropa 2017/746 untuk perangkat medis diagnostik in vitro.
	Perangkat medis diagnostik in vitro
	Nomor katalog
Rn	R adalah untuk revisi Instruksi Penggunaan dan n adalah nomor revisi
	Produsen

Riwayat Revisi

Revisi	Deskripsi
R1, Juni 2022	Versi 2, Revisi 1 <ul style="list-style-type: none">• Pembaruan pada versi 2 untuk kesesuaian terhadap IVDR• Bab untuk Zat yang mengganggu, Kontaminasi silang, Stabilitas eluat dan Kompatibilitas terhadap aplikasi downstream ditambahkan

Untuk informasi pelisensian terbaru dan penafian produk-spesifik, lihat buku pegangan atau panduan pengguna kit QIAGEN. Buku pegangan atau panduan pengguna kit QIAGEN tersedia di www.qiagen.com atau dapat dipesan dari Layanan Teknis QIAGEN atau distributor lokal Anda.

Merek Dagang: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, QIAamp®, EZ1®, UltraRun® (QIAGEN Group); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.). Nama, merek dagang terdaftar, dll. yang digunakan di dalam dokumen ini, meski tidak secara khusus ditandai sebagaimana demikian, tidak akan dianggap tidak dilindungi oleh undang-undang.

06/2022 HB-3029-D01-001 © 2022 QIAGEN, hak cipta dilindungi undang-undang.

