

# QIASymphony® DSP DNA Kit Kullanım Talimatları (Performans Özellikleri)

Sürüm 2

**IVD**

İn Vitro Tanı Amaçlı Kullanım İçindir

QIASymphony DSP DNA Mini Kit ve QIASymphony DSP DNA Midi Kit ile kullanım içindir

**CE**

**REF**

937236, 937255



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Almanya

**R1**

Performans Özellikleri elektronik ortamda mevcuttur ve [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresinin ürün sayfasındaki kaynaklar sekmesi altında bulunabilir.

# Genel Giriş

QIASymphony DSP DNA Kit'lerin yalnızca QIASymphony SP ile bir arada kullanılması amaçlanmıştır.

QIASymphony DSP DNA Mini Kit'ler, DNA'nın insan tam kanından, Beyaz Kan Hücreleri Tabakası dokusundan ve formalinle fikse edilip parafine gömülmüş (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) doku örneklerinden, viral DNA'nın ise insan tam kanından otomatik olarak saflaştırılması için reaktif sağlar. QIASymphony DSP DNA Midi Kit'ler, insan tam kanından ve beyaz kan hücreleri tabakasından toplam DNA'nın otomatik saflaştırılması için reaktif sağlar. Bununla birlikte, her kan toplama tüpü ya da doku türü için performans özellikleri belirlenmemiştir ve bu özelliklerin kullanıcı tarafından doğrulanması gerekir.

Manyetik partikül teknolojisi; proteinler, nükleazlar ve diğer saf olmayan kısımlar içermeyen yüksek kalitede nükleik asitlerin saflaştırılmasını mümkün kılar. Saflaştırılmış nükleik asitler, amplifikasyon reaksiyonları (PCR) gibi aşağı akış uygulamalarında doğrudan kullanıma hazırdır. QIASymphony SP, saflaştırma işleminin tüm adımlarını gerçekleştirir. Tek bir çalışmada 24'lük gruplar halinde 96 adede kadar örnek işlenir.

Aşağıda farklı uygulamalara yönelik performans verileri gösterilmektedir.

# Performans Özellikleri

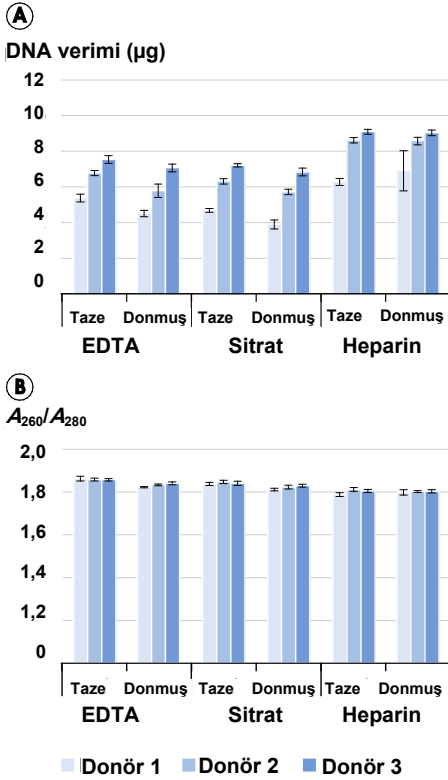
**Not:** Performans Özellikleri büyük oranda çeşitli faktörlere bağlı olup belirli aşağı akış uygulamalarıyla ilgilidir. Örnek niteliğindeki aşağı akış uygulamalarıyla bağlantılı olarak QIASymphony DSP DNA Mini ve Midi Kit'ler için oluşturulmuşlardır. Bununla birlikte, nükleik asitleri biyolojik numuneden izole etmeye yönelik yöntemler, çoklu aşağı akış uygulamaları için bir ön uç olarak kullanılır. Aşağı akış uygulaması geliştirmenin bir parçası olarak bu tür bir iş akışı için çapraz kontaminasyon veya çalışma kesinliği gibi performans parametreleri oluşturulmalıdır. Bu nedenle, uygun performans parametrelerini oluşturmaya yönelik tüm iş akışını doğrulamak kullanıcının sorumluluğundadır.

## Temel performans ve çeşitli aşağı akış uygulamaları ile uyumluluk

### DNA kanı ve beyaz kan hücresi tabakası

#### DNA verimi

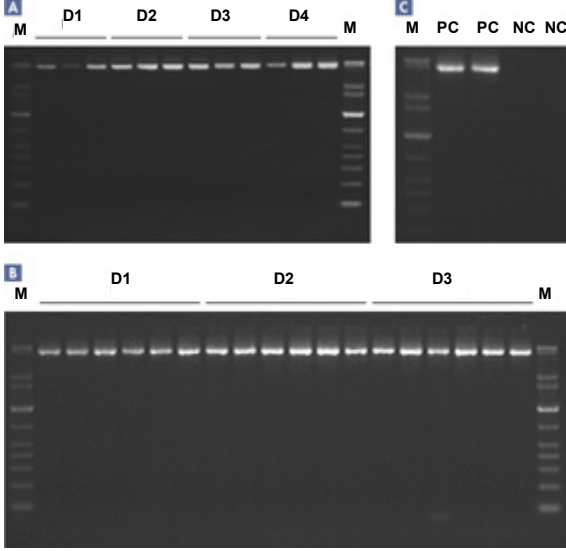
QIASymphony DSP DNA Mini Kit'in temel performansı, farklı toplama tüpleri ve antikoagülanların yanı sıra taze ve donmuş insan tam kanı kullanarak değerlendirilmiştir. 3 farklı tüp türünde 3 sağlıklı donörden (akyuvar [white blood cell, WBC] sayısı 4,0 ila 11,0 x 10<sup>6</sup> hücre/ml) tam kan alınmıştır: EDTA, 10 ml BD™ Vacutainer® 16 x 100 mm (K2-EDTA); sitrat, 2,7 ml Sarstedt® S-Monovette® 9NC Tube 13 x 75 mm (sitrat); heparin, 7,5 ml Sarstedt S-Monovette 15 x 92 mm (Li-Heparin). Kan, taze (2-8°C'de saklanmış) ya da donmuş (-20°C'de saklanmış) olarak kullanılmıştır. Genomik DNA, QIASymphony DSP DNA Mini Kit ve 200 µl elüsyon hacmine sahip blood 200 DSP protokolü kullanılarak donör ve tüp türü başına 4 replikat olmak üzere 200 µl örneklerden saflaştırılmıştır. DNA verimi ve saflığı spektroskopik analiz ile belirlenmiştir (Şekil 1).



**Şekil 1. Taze ve donmuş insan tam kanı ile farklı örnek toplama tüpleri ve antikoagülanlar kullanılarak DNA verimi ve saflığı. A** DNA verimi, çubukları standart sapma ile mutlak DNA verimini gösterir. **B** DNA saflığı, çubukları standart sapma ile DNA saflığını gösterir.

## DNA bütünlüğü

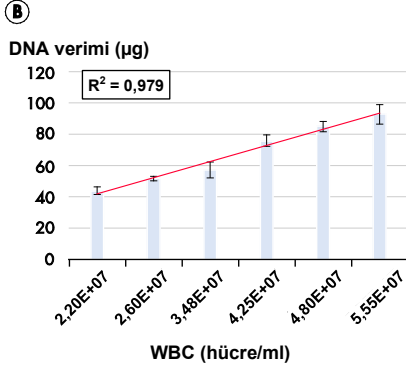
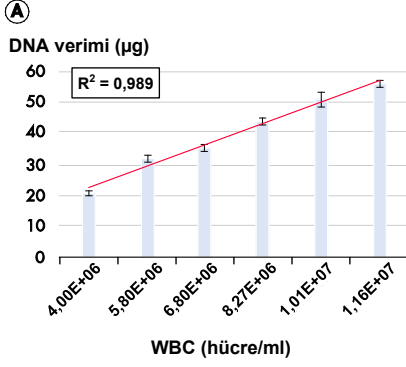
Uzun aralıklı PCR ürünleri (5 kb), LongRange PCR tahlili kullanılarak amplifiye edilmiştir (Şekil 2).



**Şekil 2. Uzun aralıklı PCR ile test edilen DNA bütünlüğü.** M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder. **A** 4 sağlıklı donörden (D) BD K2E tüplerinde tam kan toplanmıştır. Uzun aralıklı PCR için genomik DNA, QIASymphony DSP DNA Mini Kit ve 200 µl elüsyon hacimli blood 200 DSP protokolü kullanılarak üç kopya halinde 200 µl alikotlardan saflaştırılmıştır. D1, donör 1; D2, donör 2; D3, donör 3 ve D4, donör 4. **B** 3 sağlıklı donörden BD K2E tüplerinde tam kan alınmış ve beyaz kan hücreleri tabakası hazırlanmıştır. Genomik DNA, QIASymphony DSP DNA Mini Kit ve 200 µl elüsyon hacimli beyaz kan hücreleri tabakası 200 DSP protokolü kullanılarak 6 replikatta 200 µl alikotlardan saflaştırılmıştır. D1, donör 1; D2, donör 2 ve D3, donör 3. **C** Kontroller: PC, pozitif kontrol ve NC, negatif kontrol.

## DNA veriminin WBC sayısı ile korelasyonu

QIASymphony DSP DNA Kan ve beyaz kan hücreleri tabakası uygulamalarının performansı, her örnek türü için 6 farklı WBC sayısına sahip kan ve beyaz kan hücreleri tabakası örnekleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Tam kan için WBC sayıları  $4 \times 10^6$  hücre/ml ile  $11,6 \times 10^6$  hücre/ml arasında iken beyaz kan hücreleri tabakası için sayılar  $2,2 \times 10^7$  hücre/ml ile  $5,6 \times 10^7$  hücre/ml arasında değer göstermiştir. DNA verimleri spektroskopik analiz ile belirlenmiş ve WBC sayısına karşı grafik haline getirilmiştir (Şekil 3).



**Şekil 3. DNA veriminin WBC sayısı ile korelasyonu.** **A** Genomik DNA, QIAAsymphony DSP DNA Midi Kit ve 500 µl elüsyon hacimli blood 1000 DSP protokolü kullanılarak 1 ml insan tam kanından saflaştırılmıştır. Çubuklar, standart sapma ile mutlak DNA verimini gösterir. **B** Genomik DNA, QIAAsymphony DSP DNA Midi Kit ve 400 µl elüsyon hacimli beyaz kan hücre tabakası 400 DSP protokolü kullanılarak 400 µl beyaz kan hücre tabakasından saflaştırılmıştır. Çubuklar, standart sapma ile mutlak DNA verimini gösterir.

## Virüs kan

Doğruluk oranı çalışmaları, CMV negatif insan tam kanında önceden miktarı belirlenen CMV WHO standart materyali seyreltilerek gerçekleştirilmiştir. Mililitre başına 90 IU CMV virüs yükü olan örnekler için %100'lük bir saptama oranı gözlenmiştir (Tablo 1).

**Tablo 1. QIAAsymphony DSP Virüs Kan uygulamasının duyarlılığı**

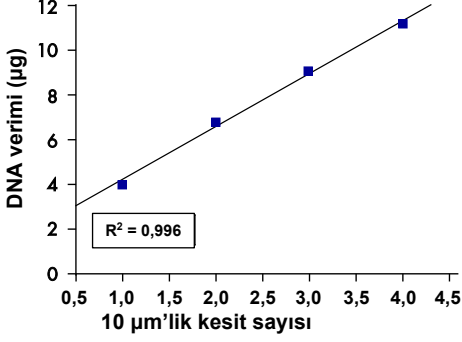
CMV (IU/ml)	Replikatlar	Belirlemeler	Belirleme (%)
350	18	18	100,00
230	32	32	100,00
115	31	31	100,00
90	32	32	100,00
60	30	24	80,00
30	30	15	50,00
15	30	10	33,33
6	21	5	23,81
2	21	2	9,52
0	15	0	0,00

İnsan tam kanı, 1 sağlıklı CMV negatif donörden BD K2E tüplerinde toplanmış ve buna farklı titreler kullanılarak CMV WHO standart materyali eklenmiştir. Viral DNA, QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit ve 60 µl elüsyon hacimli virus blood 200 DSP protokolü kullanılarak saflaştırılmıştır. Elüatlar, CMV real-time PCR tahlili ile analiz edilmiştir.

## Doku ve FFPE doku

### DNA verimi

QIASymphony DSP DNA FFPE doku uygulamasının performansı, taze kesilmiş insan dalağının 1-4, 10 µm, FFPE kesitlerinin 6 replikati kullanılarak değerlendirilmiştir. DNA ekstraksiyonu, doku düşük içerikli DSP protokolü ile QIASymphony DSP DNA Mini Kit kullanılarak yapılmıştır. Deparafinizasyon ve lizis, ksilen/etanol ön muamele yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA, 50 µl elüsyon tamponu içinde ayrıştırılmış ve DNA verimi spektroskopik analizle belirlenmiştir (Şekil 4).



**Şekil 4. DNA veriminin FFPE doku kesitlerinin sayısı ile korelasyonu.** İnsan dalağının FFPE doku kesitlerinden 1-4, 10 µm'lik altı replikat, ksilen/etanol ön muamelesi ile deparafinize edilmiştir. DNA ekstraksiyonu, QIASymphony SP üzerinde doku düşük içerikli DSP protokolü ve 50 µl elüsyon hacmi ile QIASymphony DSP DNA Mini Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### Real-time PCR ile biyobelirteçlerin mutasyonel durum analizi

Biyobelirteçlerin mutasyon durumunun analizi, insan kolonunun FFPE kesitlerinden ekstrakte edilen DNA ve insan akciğer dokusu örneklerinden ekstrakte edilen DNA kullanılarak yapılmıştır.

FFPE doku örneklerinden DNA ekstraksiyonu işlemi için örnek hazırlamada insan kolonunun 3 x 10 µm kesitleri kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonu, ön muamele için Deparaffinization Solution ve 100 µl elüsyon hacmi ile doku düşük içerikli DSP protokolü kullanılarak yapılmıştır. Biyobelirteç KRAS'ın mutasyon analizi, KRAS tespiti için tahlil el kitabına uygun şekilde real-time PCR tahlili kullanılarak yapılmıştır. Kontrol tahlilinin C<sub>T</sub> değerleri tanımlanan aralık içinde olup mutasyon saptama analizi sonucunda 12SER mutasyonu saptaması için tanımlanan kesme değeri 8'in altında olan, 4,17'lik bir ΔC<sub>T</sub> değeriyle gösterilen bir kodon 12 amino asit değişikliği tespit edilmiştir (Tablo 2).

**Tablo 2.FFPE doku KRAS biyobelirteç mutasyon analizinin sonuçları**

Örnek	Reaksiyon	Hedef C <sub>T</sub>	Dahili kontrol C <sub>T</sub>	ΔC <sub>T</sub> *
Şablonsuz kontrol	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	–
Standart	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
FFPE doku (insan kolonu)	Kontrol	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	–

\* ΔC<sub>T</sub> = M C<sub>T</sub> – C C<sub>T</sub>, burada M harfi mutasyona ve C harfi kontrole karşılık gelir; n.d., tespit edilemedi.

Dondurulmuş doku örneklerinden DNA ekstraksiyonu için, doku yüksek içerikli DSP protokolü ve 200 µl elüsyon hacmi kullanılarak örnek hazırlamada 25 mg insan akciğer dokusu kullanılmıştır. EGFR biyobelirtecinin mutasyon analizi, EGFR için real-time PCR tahlili kullanılarak yapılmıştır. Kontrol ve mutasyon tespiti analizi, tahlil el kitabında tarif edildiği üzere gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, bir mutasyonun tespiti için tanımlanan kesme değeri 12'nin altında olan 2,47'lik bir ΔC<sub>T</sub> değeri ile gösterildiği gibi, EGFR geninde bir delesyon olduğunu ortaya çıkarmıştır (Tablo 3).

**Tablo 3. Donmuş doku EGFR biyobelirteç mutasyon analizinin sonuçları**

Örnek	Reaksiyon	Hedef C <sub>T</sub>	Dahili kontrol C <sub>T</sub>	ΔC <sub>T</sub> *
Şablonsuz kontrol	Kontrol	0,00	31,71	-
	T790M	0,00	32,36	-
	Delesyonlar	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	-
Standart	Kontrol	28,78	31,05	-
	T790M	30,08	31,13	1,30
	Delesyonlar	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
Doku (insan akciğeri)	Kontrol	25,76	31,23	-
	T790M	n.d.	31,99	-
	Delesyonlar	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>, burada M harfi mutasyona ve C harfi kontrole karşılık gelir; n.d., tespit edilemedi.

## Tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik

### DNA kanı

DNA ekstraksiyonu, 200 µl elüsyon hacimli blood 200 DSP protokolü kullanılarak yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik, her biri 24 örnekle 4 grup ile 3 farklı günde 3 bağımsız çalışma (her birinde 96 örnek) gerçekleştiren tek bir operatör tarafından değerlendirilmiştir (Tablo 4 ve Tablo 5).

Yeniden üretilebilirlik, her bir çalışma 24 örnekle 4 gruptan oluşacak şekilde farklı QIASymphony SP cihazlarında 3 farklı operatör tarafından ve 3 farklı günde 3 bağımsız çalışma (her birinde 96 örnek) gerçekleştirilerek değerlendirilmiştir (Tablo 6 ve Tablo 7).



**Tablo 4. Tekrarlanabilirlik değerlendirmesinin sonuçları**

Çalışma	Grup	n	Ortalama DNA verimi (µg)	SS	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
Toplam	–	288	4,96	–	–

n, Replikasyon sayısı; SD, standart sapma; CV, varyasyon katsayısı.

**Tablo 5. Tekrarlanabilirlik değerlendirmesi için kesinlik verileri**

	SS	CV
Aynı çalışma içinde gruplar arası	0,25	4,95
Genel tekrar doğruluğu	0,26	5,18

SD, standart sapma; CV, varyasyon katsayısı.

**Tablo 6. Yeniden üretilebilirlik değerlendirmesinin sonuçları**

Çalışma	Grup	n	Ortalama DNA verimi (µg)	SS	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
Toplam	–	288	5,38	–	–

n, Replikasyon sayısı; SD, standart sapma; CV, varyasyon katsayısı.

**Tablo 7. Yeniden üretilebilirlik değerlendirmesi için kesinlik verileri**

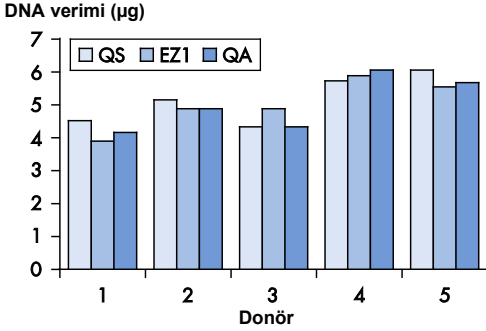
	SS	CV
Aynı çalışma içinde gruplar arası	0,25	4,73
Genel tekrar doğruluğu	0,38	7,03

SD, standart sapma; CV, varyasyon katsayısı.

## Karşılaştırmalı performans

### DNA Kanı

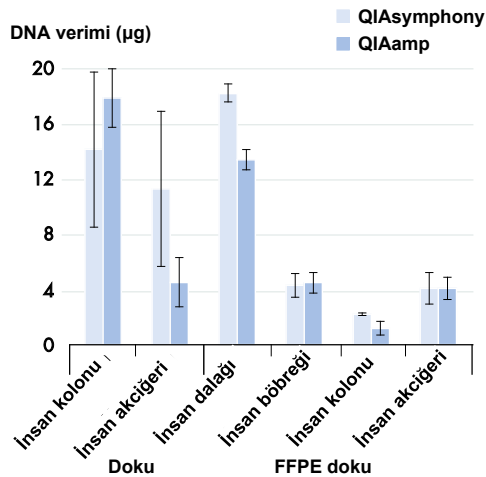
Performans, EZ1® DSP DNA kan sistemi ve QIAamp® DNA Blood Mini Kit manuel hazırlama prosedürüyle karşılaştırmalı olarak QIASymphony DSP DNA kan sistemi için analiz edilmiştir. DNA, farklı kan örneklerinden saflaştırılıp DNA verimi için analiz edilmiştir (Şekil 5).



**Şekil 5. Farklı kan DNA saflaştırma sistemleri arasında DNA verimlerinin karşılaştırılması.** 5 sağlıklı donörden BD K2E tüplerinde tam kan toplanmıştır. Tüm yöntemler için 200 µl örnek girdisi hacmi ve 200 µl elüsyon hacmi kullanılmıştır. QS, QIASymphony DSP DNA Mini Kit ve blood 200 DSP protokolü; EZ1, EZ1 DSP DNA Blood Kit kullanan EZ1 Advanced XL; QA, QIAamp DNA Blood Mini Kit. Çubuklar, her örnek için mutlak DNA verimini gösterir.

### Doku ve FFPE doku

QIASymphony DSP DNA Mini Kit'in performansı, örnek materyal olarak sırasıyla FFPE dokusu ile taze ve donmuş dokular kullanılarak manuel QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit ve QIAamp DSP DNA Mini Kit'in performansı ile karşılaştırılmıştır. Manuel ve otomatik örnek hazırlamanın yanı sıra DNA verimlerinin kantifikasyonu eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. QIASymphony DSP DNA Mini Kit, QIAamp DSP DNA Mini Kit (doku) ve QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (FFPE doku) kullanılarak taze/dondurulmuş ve FFPE doku örneklerinden yapılan ekstraksiyondan sonra elde edilen DNA verimleri Şekil 6'da gösterilmektedir.



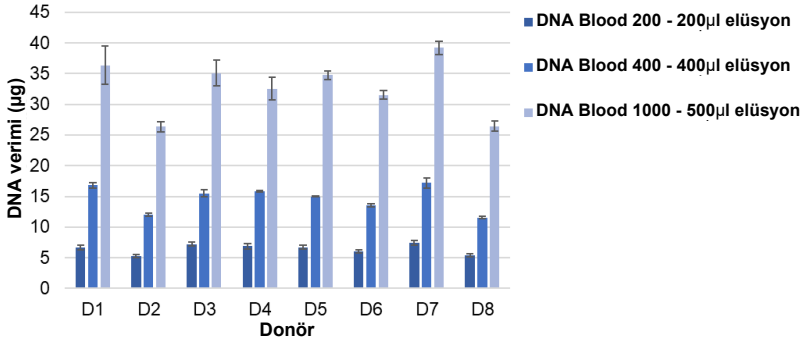
**Şekil 6. Doku ve FFPE doku örneklerinden DNA ekstraksiyonu.** Taze/dondurulmuş doku için insan akciğeri ve kolon örnekleri 6 x 25 mg'lık parçalar halinde kesilmiştir. Örnek hazırlama için her doku tipinden üç parça, doku yüksek içerikli DSP protokolü ve QIASymphony SP ile kullanılmıştır. Kalan örneklerden DNA ekstraksiyonu, QIAamp DSP DNA Mini Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA 200 µl içinde ayrıştırılmış olup DNA verimi spektroskopik analizle belirlenmiştir. FFPE dokusundan DNA ekstraksiyonu için çeşitli insan organlarından 3 x 10 µm FFPE doku kesitleri içeren 12 replikat hazırlanmıştır. Deparaffinization Solution ön muamelesi ve doku düşük içerikli DSP protokolü ile birlikte QIASymphony SP kullanılarak örnek hazırlama için altı örnek kullanılmıştır. Kalan örneklerden DNA ekstraksiyonu, QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA 50 µl içinde ayrıştırılmış olup DNA verimi spektroskopik analizle belirlenmiştir. Çubuklar, standart sapma ile mutlak DNA verimini gösterir.

## Örnek girdisi/elüat çıktısı aralığı

### DNA kanı

DNA kan uygulaması için farklı örnek girdisi ve elüat çıktısı aralıkları, WBC sayı aralığı 5,0 ila 8,0 x 10<sup>6</sup> hücre/ml olan kan donörlerinden alınan örnekler kullanılarak karşılaştırılmıştır.

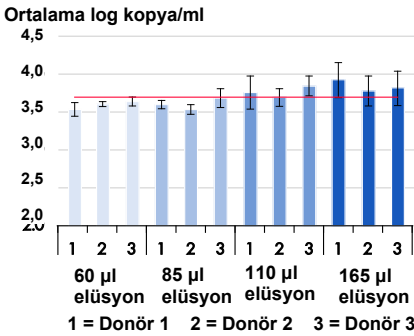
8 sağlıklı donörden BD K2E tüplerinde tam kan toplanmıştır. DNA, her biri için QIAasymphony DSP DNA Mini/Midi Kit ve 200 µl elüsyon hacimli DNA blood 200 DSP protokolü, 400 µl elüsyon hacimli DNA blood 400 DSP protokolü ve 500 µl elüsyon hacimli DNA blood 1000 DSP protokolü kullanılarak 6 replikattan saflaştırılmıştır (Şekil 7).



**Şekil 7. Kan DNA saflaştırma sistemleri için farklı örnek girdilerinin ve elüsyon hacimlerinin karşılaştırılması.** 8 sağlıklı donörden BD K2E tüplerinde tam kan toplanmıştır. DNA ekstraksiyonu, 200 µl elüsyon hacimli DNA blood 200 protokolü, 400 µl elüsyon hacimli DNA blood 400 protokolü ve 500 µl elüsyon hacimli DNA blood 1000 protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA verimi spektroskopik analiz ile belirlenmiştir. Çubuklar, her donör için mutlak DNA verimini (standart sapma ile ortalama değer) gösterir.

### Virüs kan

WBC sayı aralığı 4,0 ila 11,0 x 10<sup>6</sup> hücre/ml olan 3 sağlıklı donörden BD K2E tüplerinde tam kan toplanmış ve buna CMV standart materyali (titre 3,7 log kopya/ml) eklenmiştir. Viral DNA, her biri için QIAasymphony DSP DNA Mini Kit ve 4 farklı elüsyon hacmine sahip virus blood 200 DSP protokolü kullanılarak 7 replikattan saflaştırılmıştır (Şekil 8).



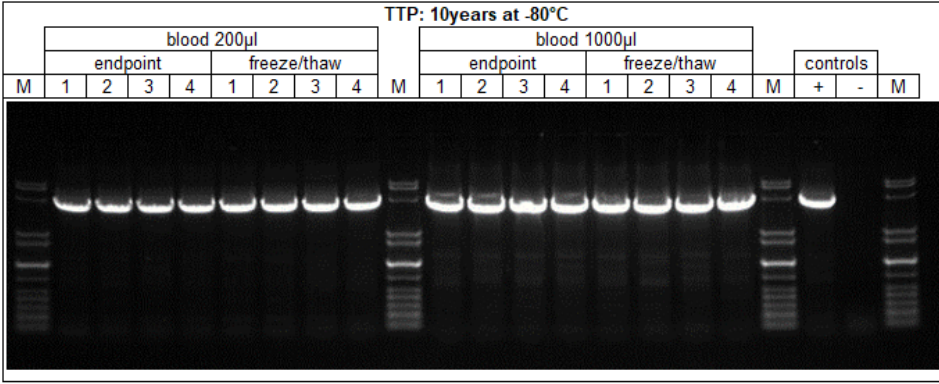
**Şekil 8. Farklı elüsyon hacimleri için viral DNA kantifikasyonunun karşılaştırılması.** Her donör numunesinden ve elüsyon hacminden (60, 85, 110 ve 165 µl) elüatlar, CMV real-time PCR tahlili ile analiz edilmiştir. Kırmızı çizgi hedef titreyi temsil ederken çubuklar, standart sapma ile mililitre başına ortalama log kopyaları gösterir.

## Elüat stabilitesi

**Not:** Elüat stabilitesi büyük ölçüde çeşitli faktörlere bağlı olup spesifik aşağı akış uygulamasıyla ilgilidir. Örnek niteliğindeki aşağı akış uygulamalarıyla bağlantılı olarak QIASymphony DSP Mini ve Midi Kit için belirlenmiştir. Laboratuvarda kullanılan spesifik aşağı akış uygulamasının kullanım talimatlarına başvurmak ve/veya uygun saklama koşullarını sağlamaya yönelik iş akışını belirlemek kullanıcının sorumluluğundadır.

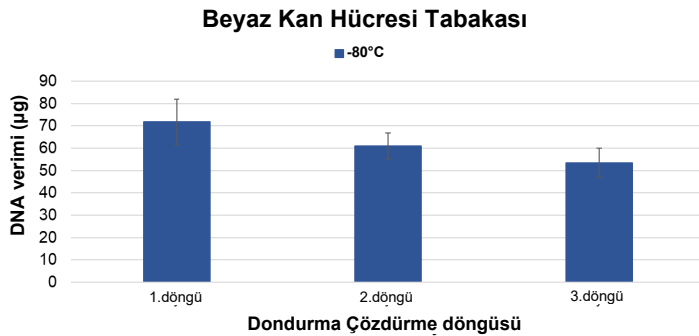
## DNA kanı ve Beyaz Kan Hücresi Tabakası

DNA kan uygulaması için elüat stabilitesi, 200 µl elüsyon hacimli DNA Blood 200 protokolü ve 500 µl elüsyon hacimli DNA Blood 1000 protokolü ile gerçekleştirilen QS çalışmalarından elüatlar kullanılarak test edilmiştir. Elüatlar 2ml Sarstedt Tube'larda oda sıcaklığında, 2-8°C'de, -20°C'de ve -80°C'de saklanmıştır. DNA verimi ve saflığı spektroskopik analiz ile belirlenmiştir. DNA bütünlüğü jel elektroforezi ve LongRange PCR tahlili ile analiz edilmiştir (Şekil 9).



**Şekil 9. DNA kanı için elüat stabilitesi.** DNA, DNA Blood 200 µl ve 1000 µl protokolleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Elüatlar -80°C'de 2 ml Sarstedt Tüplerinde saklanmıştır. Dört replikat analiz edilmiştir. DNA bütünlüğü, uzun aralıklı PCR ile test edilmiştir. Rakamlar, 10 yıllık saklama sonrası sonuçları göstermektedir. M, QIAGEN GelPilot 1 kb Plus Ladder.

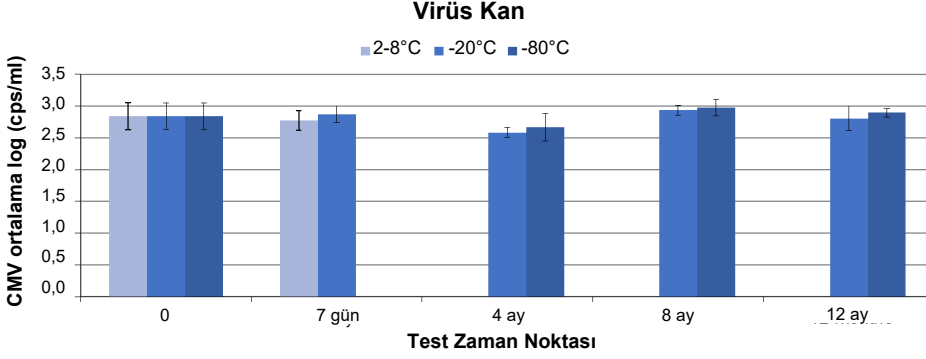
Beyaz Kan Hücresi Tabakası uygulaması için elüat stabilitesi, BC 400 µl protokolü ve 200 µl elüsyon hacmi ile gerçekleştirilen QS çalışmalarından elüatlar kullanılarak test edilmiştir. Elüatlar 2 ml Sarstedt Tube'larda ve Elution Micro Tube Rack'lerde oda sıcaklığında, 2-8°C'de, -20°C'de ve -80°C'de saklanmıştır. Ek olarak 3 döngüye kadar donma/çözülme testine tabi tutulmuştur (Şekil 10). DNA verimi ve saflığı spektroskopik analiz ile belirlenmiştir. DNA bütünlüğü, jel elektroforezi ve LongRange PCR tahlili (50 µl reaksiyon) ile analiz edilmiştir.



**Şekil 10. Beyaz Kan Hücresi Tabakası için elüat dondurma/çözürme döngüleri.** DNA, DNA BC 400 µl protokolü kullanılarak saflaştırılmıştır. Beyaz Kan Hücresi Tabakası, EDTA kandan üretilmiştir. Elüatlar 2 ml Sarstedt Tube'larda saklanmıştır. DNA verimi, 3 dondurma/çözürme döngüsünde aynı elüat kullanılarak test zaman noktalarında belirlenmiştir. DNA verimi spektroskopik analiz ile belirlenmiştir. Çubuklar, mutlak DNA verimini (standart sapma ile ortalama değer) gösterir.

## Virüs kan

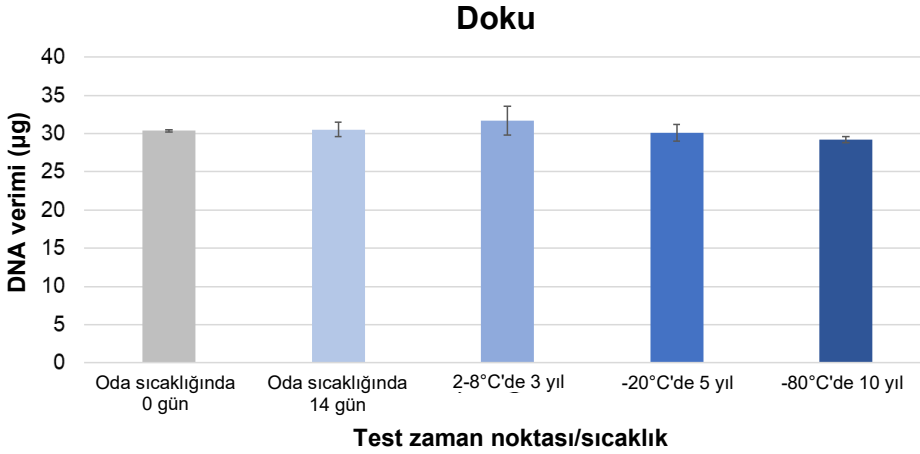
Virüs kan uygulaması için elüat stabilitesi, 60 µl elüsyon hacimli Virus Blood 200 protokolü ile gerçekleştirilen QS çalışmalarından elüatlar kullanılarak test edilmiştir. Örnek materyali olarak ticari CMV standardı (titre 2,7 log kopya/ml) eklenmiş K<sub>2</sub> EDTA kan kullanılmıştır. Elüatlar 2-8°C, -20°C ve -80°C'de 2 ml Sarstedt Tube'larda saklanmıştır. Elüatlar CMV gerçek zamanlı tahlil kullanılarak analiz edilmiştir (Şekil 11). Aşağıda, birkaç test zaman noktasının sonuçları gösterilmektedir.



**Şekil 11. Virüs kan uygulaması için elüat stabilitesi.** Ticari CMV standardı eklenmiş EDTA kan örnekleri, Virus Blood 200 protokolü ile saflaştırılmıştır. Elüatlar, Elution Micro Tube Rack'lerde ve 2 ml Sarstedt Tube'larda çeşitli sıcaklıklarda saklanmıştır. Her bir test zaman noktası başına 4 replikat analiz edilmiştir. Çubuklar CMV titresini gösterir (standart sapma ile ortalama log değeri).

## Doku

Doku uygulaması için elüat stabilitesi, Tissue HC 200 µl protokolü ve 200 µl elüsyon hacmi kullanılarak test edilmiştir. Örnek materyal olarak taze sığır karaciğeri kullanılmıştır. Elüatlar 2 ml Sarstedt Tube'larda ve Elution Micro Tube Rack'lerde oda sıcaklığında, 2-8°C'de, -20°C'de ve -80°C'de saklanmıştır. DNA verimi ve saflığı spektroskopik analiz ile belirlenmiştir (Şekil 12). DNA bütünlüğü jel elektroforezi ile analiz edilmiştir.

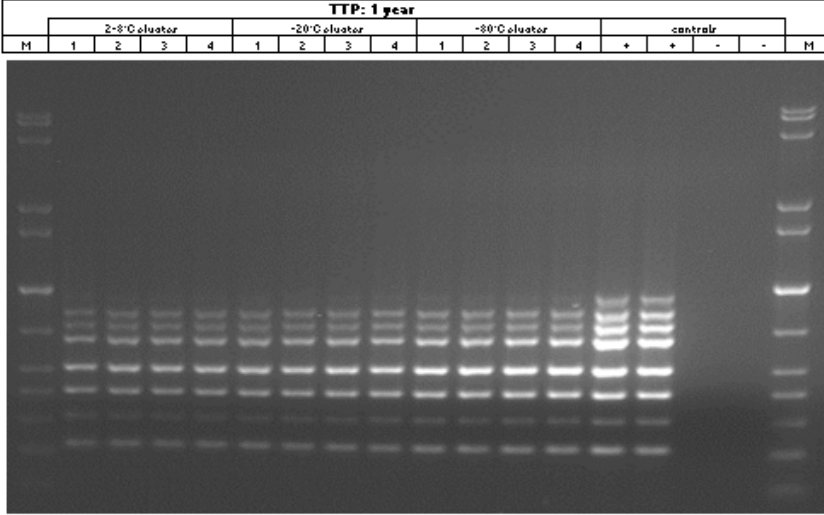


**Şekil 12. Doku için elüat stabilitesi.** DNA, 200 µl elüsyon hacimli DNA Tissue HC protokolü kullanılarak saflaştırılmıştır. Örnek materyal olarak taze sığır karaciğeri kullanılmıştır. Elüatlar, Elution Micro Tube Rack'lerde ve 2 ml Sarstedt Tube'larda çeşitli sıcaklıklarda saklanmıştır. Her bir test zaman noktası başına 4 replikat analiz edilmiştir. DNA verimi spektroskopik analiz ile belirlenmiştir. Çubuklar, mutlak DNA verimini (standart sapma ile ortalama değer) gösterir.

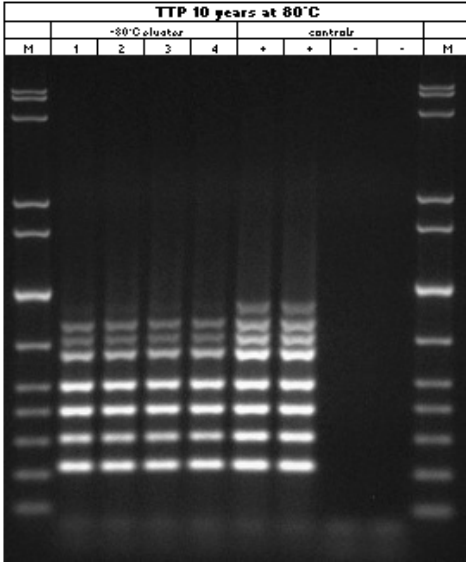
## FFPE doku

FFPE doku uygulaması için elüat stabilitesi, Tissue LC 200 µl protokolü ve 100 µl elüsyon hacmi kullanılarak test edilmiştir. Örnek materyal olarak ticari insan FFPE doku kullanılmıştır. Elüatlar 2 ml Sarstedt Tube'larda ve Elution Micro Tube Rack'lerde oda sıcaklığında, 2-8°C'de, -20°C'de ve -80°C'de saklanmıştır. Elüatlar 8 pleksli insan PCR tahlili ile analiz edilmiştir (Şekil 13). Aşağıda, iki test zaman noktasının sonuçları gösterilmektedir.

A:



B:



**Şekil 13. FFPE doku için elüat stabilitesi.** DNA, DNA Tissue LC protokolü kullanılarak saflaştırılmıştır. Örnek materyal olarak ticari FFPE doku kullanılmıştır. Elüatlar, Elution Micro Tube Rack'lerde ve 2 ml Sarstedt Tube'larda çeşitli sıcaklıklarda saklanmıştır. Her bir test zaman noktası başına 4 replikat analiz edilmiştir. Elüatlar kurum içi 8 pleksli insan PCR tahlili ile analiz edilmiştir.

## Olumsuz etkileyen maddeler

Tam kanda bulunabilecek inhibe edici maddelerin DNA kan, virüs kan ve doku uygulaması performansı üzerindeki etkisi aşağıdaki maddelerin eklenmesiyle test edilmiştir:

**Tablo 8. Farklı uygulamalar için test edilen potansiyel olumsuz etkileyen maddeler**

Olumsuz etkileyen maddeler	Konsantrasyon	Kan	Virüs kan	Doku
Bilirubin	200 mg/L	√	√	√
Hemoglobin	200 g/L	√	√	
Trigliseritler	30 g/L	√	√	√
Protein	120 g/L	√	√	√

**Not:** "√", ilgili potansiyel olumsuz etkileyen madde için hangi örnek materyallerinin test edildiğini gösterir.

Hemoglobin (200 g/l) ve protein (120 g/l) için, kan örneğindeki mevcut seviyeler belirlendikten sonra sırasıyla 200 veya 120 g/l olmak üzere belirtilen konsantrasyonlara ulaşmak için ek hemoglobin veya protein eklenmiştir. Bilirubin (200 mg/l) ve trigliseritlerde (30 g/l), belirtilen konsantrasyonları elde etmek için örneklere her maddenin toplam miktarı eklenmiştir.

Doku için, her maddenin toplam miktarı doğrudan lizatlara eklenmiş; kullanılan doku örneğinin bilirubin, trigliserit veya protein konsantrasyonu için herhangi bir belirleme yapılmamıştır.

Herhangi bir potansiyel olumsuz etkileyen madde (örn. ilaçlar) ve ilgili konsantrasyon, aşağı akış uygulamasına ve hastanın olası önceki tıbbi tedavilerine özel olup QIASymphony DSP DNA Mini ve Midi Kit'ler kullanılarak bu tür bir aşağı akış uygulamasının doğrulanması esnasında araştırılmalıdır.

**Not:** Test işlemi, ekstrakte edilen nükleik asitlerin kalitesinin değerlendirilmesi için örnek aşağı akış uygulamaları kullanılarak yapılmıştır. Bununla birlikte, farklı aşağı akış uygulamalarının saflık açısından farklı gereksinimleri olabilir (örn. potansiyel olumsuz etkileyen maddelerin yokluğu veya konsantrasyonu); bu nedenle ilgili maddelerin ve ilgili konsantrasyonların tanımlanması ve test edilmesi, QIASymphony DSP Mini ve Midi Kit'ler içeren bir iş akışında aşağı akış uygulaması geliştirmenin bir parçası olarak gerçekleştirilmelidir.

**Not:** Lütfen QIASymphony DSP DNA Midi Kit'in geliştirilmesi sırasında heparinin performans üzerinde olumsuz bir etkisi olduğuna dair herhangi bir belirti bulunmadığını unutmayın. Ancak ISO 20186-2:2019(E), kan toplama tüplerinden gelen heparinin izole edilmiş nükleik asitlerin saflığını etkileyebileceğini ve elüatlara olası bir taşınmanın bazı aşağı akış uygulamalarında inhibisyonlara neden olabileceğini belirtmektedir. Bu nedenle, heparinin iş akışı üzerinde olumsuz bir etkisi olup olmadığını doğrulamak kullanıcının sorumluluğundadır.

## DNA kanı ve Beyaz Kan Hücresi Tabakası

DNA kan uygulamaları testi, 200 ve 500 µl elüsyon hacimleri ile en yüksek örnek girdisi hacmi olan DSP DNA 1000 protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Elüatlar, DNA verimi ve saflığı için spektroskopik analizle incelenmiştir. PCR uyumluluğu, real-time PCR ile son nokta PCR tahlili kullanılarak test edilmiştir.

Tablo 9'da listelenen maddelerin hiçbiri engelleyici değildir; bununla birlikte, yüksek konsantrasyonda trigliserit (>30 g/l) içeren kan örnekleri gDNA veriminin düşmesine neden olabilir.

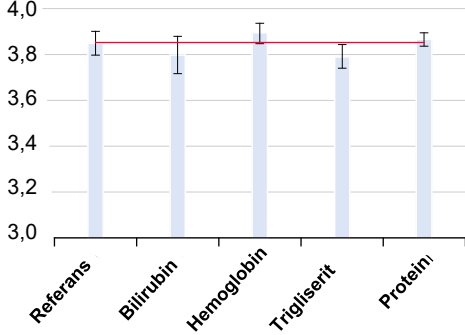
## Virüs kan

Virüs kan uygulaması için, testler 60 µl elüsyon hacimli DSP Virus Blood 200 protokolüyle gerçekleştirilmiştir. CMV negatif kan örneklerine, bir ticari CMV standardından 500 kopya/ml (düşük konsantrasyon) ve  $1 \times 10^4$  kopya/ml (yüksek konsantrasyon, Şekil 14) eklenmiştir.

Elüatlar, CMV Real-time PCR tahlili ile analiz edilmiştir.

Tablo 9'da listelenen maddelerin hiçbiri engelleyici değildir; bununla birlikte, yüksek konsantrasyonda trigliserit (>30 g/l) içeren kan örnekleri viral DNA saflaştırmasında düşüşe neden olabilir.

### Ortalama log kopya/ml



**Şekil 14. İnhibe edici madde testi.** 1 sağlıklı donörden BD K2E tüplerinde tam kan toplanmış ve buna CMV standart materyali (titre 4,0 log kopya/ml) eklenmiştir. Olası inhibe edici maddeler eklenerek beş örnek test edilmiş; viral DNA, QIA Symphony DSP DNA Mini Kit ve 165 µl elüsyon hacimli virus blood 200 DSP protokolü kullanılan örneklerin her birinin 4 replikatından saflaştırılmıştır. Elüatlar, CMV real-time PCR tahlili ile analiz edilmiştir. Kırmızı çizgi, herhangi bir inhibe edici madde eklenmemiş referans örnekler için belirlenen titreyi temsil eder; çubuklar ise standart sapma ile mililitre başına ortalama log kopyasını gösterir.

## Doku

DNA dokusu (taze ve dondurulmuş) için test, 200 µl elüsyon hacmi ile DSP DNA HC protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Elüatlar, DNA verimi ve saflığı için spektroskopik analizle incelenmiştir. PCR uyumluluğu, real-time PCR tahlili ile test edilmiştir.

Tablo 9'da listelenen maddelerden hiçbirinin örnek hazırlama üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu tespit edilmemiştir.

## FFPE doku

FFPE doku için test, 50 µl elüsyon hacmi ile DSP DNA LC protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Maddeler (bkz. Tablo 9), doğrudan lizata eklenmiştir.



**Tablo 9. Farklı uygulamalar için test edilen potansiyel olumsuz etkileyen maddeler**

Olumsuz etkileyen maddeler	Lizat içerisinde konsantrasyon
Ksilen	%11'e kadar
Etanol	%11'e kadar
Deparafinizasyon Çözeltilisi	%11'e kadar
Parafin	0,1 µM kesit

Elüatlar, DNA verimi ve saflığı için spektroskopik analizle incelenmiştir. PCR uyumluluğu, real-time PCR ve kurum içi 8 pleksli insan PCR tahlili kullanılarak test edilmiştir.

Tablo 9'da listelenen maddelerden hiçbirinin örnek hazırlama üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu tespit edilmemiştir.

## Çapraz kontaminasyon





### DNA kanı

QIASymphony DNA Blood uygulamasının çapraz kontaminasyon riski, QIASymphony SP cihazında değişen dama tahtası gruplarıyla (değişen pozitif ve negatif örnekler) dört adet 96 örneklilik çalışma gerçekleştirilerek ve tamamen negatif gruplarla kesintiye uğratılarak analiz edilmiştir. Model sistem olarak erkek kanı ( $\geq 1,0 \times 10^7$  hücre/ml'lik WBC sayısı olan erkek kanı ve  $4,0 \times 10^6$  ve  $9 \times 10^6$  hücre/ml arasında WBC sayısı olan kadın kanı) kullanılmıştır. Örnek hazırlama, en yüksek örnek hacmine sahip olan blood 1000 µl protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon çalışmaları sırasında negatif kadın örneklerinin olası kontaminasyonu, Y kromozomu için real-time PCR kullanımıyla takip eden elüat analizi ile değerlendirilmiştir.

Örnekler arası, gruplar arası ya da çalışmalar arasında taşınma için çapraz kontaminasyon tespit edilmemiştir.

## Semboller

Bu belgede aşağıdaki semboller yer almaktadır. Kullanım talimatlarında ya da ambalaj ve etiketlemede kullanılan sembollerin tam listesi için lütfen el kitabına bakın.

Sembol	Sembol tanımı
	Bu ürün, in vitro tanı amaçlı tıbbi cihazlar için Avrupa Yönetmeliđi 2017/746'nın gerekliliklerini karşılamaktadır.
	İn vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz
	Katalog numarası
Rn	R, Kullanım Talimatları revizyonu olup n ise revizyon numarasıdır
	Üretici

## Revizyon Geçmiři

### Revizyon

### Açıklama

R1, Haziran 2022

Sürüm 2, Revizyon 1

- IVDR uyumu için sürüm 2'ye güncelleme
- Olumsuz etkileyen maddeler, çapraz kontaminasyon, Elüat stabilitesi ve Aşağı akış uygulamalarına uyumluluk bölümleri eklendi

Güncel lisanslama bilgileri ve ürüne özgü yasal uyarılar için ilgili QIAGEN kiti el kitabı veya kullanım kılavuzuna bakın. QIAGEN kit el kitapları ve kullanım kılavuzları [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresinde bulunabilir veya QIAGEN Teknik Servisleri veya yerel distribütörünüzden istenebilir.

Ticari Markalar: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, QIAamp®, EZ1®, UltraRun® (QIAGEN Group); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.). Bu belgede geçen tescilli adlar, ticari markalar vb. açıkça bu şekilde belirtilmemiş olsa bile yasalarca korunmaktadır.

06/2022 HB-3029-D01-001 © 2022 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

