



Czerwiec 2022 r.

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

Wersja 2



Do diagnostyki in vitro

Do użytku z zestawem QIASymphony DSP Circulating DNA Kit



937556



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Niemcy

R1

Parametry skuteczności są dostępne w wersji elektronicznej i można je znaleźć na stronie produktu pod adresem [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com), na karcie Resource (Materiały źródłowe).

## Wprowadzenie ogólne

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

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

Zestaw QIASymphony DSP Circulating DNA Kit zawiera odczynniki umożliwiające wykonanie w pełni zautomatyzowanego jednoczesnego oczyszczania ccfDNA z próbek różnego rodzaju osocza ludzkiego (z dodatkiem stabilizatorów profilu ccfDNA, np. probówki Cell-Free DNA BCT<sup>®</sup> firmy Streck<sup>®</sup>, jak również bez dodatku stabilizatorów profilu ccfDNA, np. probówki z dodatkiem EDTA) oraz próbek ludzkiego moczu (z dodatkiem i bez dodatku stabilizatorów profilu ccfDNA). Wartości parametrów skuteczności dla poszczególnych probówek do pobierania krwi nie zostały jednak określone, dlatego użytkownik jest zobowiązany do walidacji działania tych probówek.

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

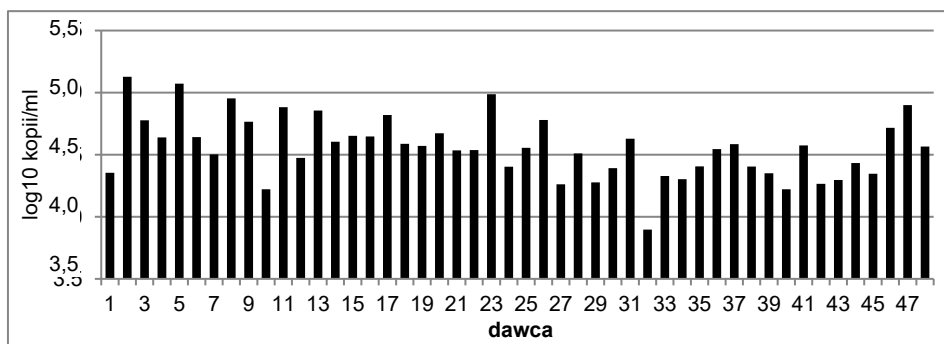
Aparat QIASymphony SP wykonuje wszystkie etapy procedury oczyszczania. W ramach jednego cyklu można przetworzyć maksymalnie 96 próbek w partiach po 24 próbki. W przypadku próbek moczu może być wymagane ręczne wstępne przygotowanie próbek.

**Uwaga:** Parametry skuteczności w dużym stopniu zależą od różnych czynników i odnoszą się do konkretnej dalszej procedury analitycznej. Została ustalona dla zestawu QS DSP Circulating DNA Kit używanego w ramach standardowych dalszych procedur analitycznych. Pomimo że metody izolacji kwasów nukleinowych z próbek biologicznych stanowią etap początkowy dla wielu dalszych procedur analitycznych, parametry skuteczności, takie jak np. występowanie zanieczyszczenia krzyżowego lub precyzja testu, muszą zostać określone dla całego przepływu pracy (z uwzględnieniem wszystkich procedur) jako część procesu opracowywania konkretnej dalszej procedury analitycznej. Z tego względu użytkownik jest odpowiedzialny za walidację całego przepływu pracy w celu ustalenia odpowiednich parametrów do oceny skuteczności.

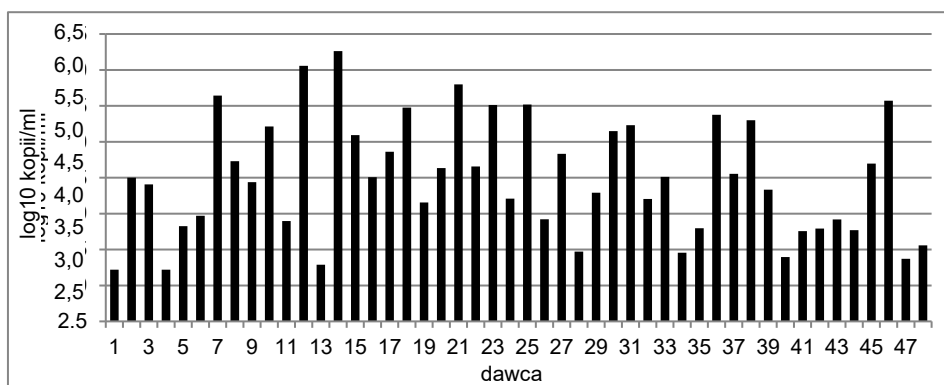
## Skuteczność podstawowa

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

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



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



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

## Precyzja testu

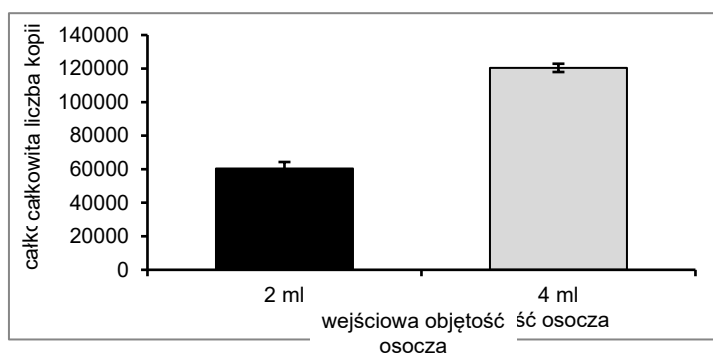
Współczynniki zmienności (Coefficient of Variation, CV) zostały określone dla ccfDNA wyizolowanego z ludzkich próbek osocza z dodatkiem EDTA. Na potrzeby analizy precyzji uzysk ccfDNA został oznaczony ilościowo przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR ukierunkowanego na sekwencję kodującą cząsteczkę 18S. Łącznie przeprowadzono 10 testów przy użyciu produktu QIASymphony. W każdym teście wykorzystano 4 partie próbek (każda partia składała się z 8 powtórzeń). Dane dotyczące precyzji przedstawiono w Tabeli 1.

**Tabela 1. Analiza oszacowań wartości precyzji**

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

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

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



**Ryc. 3. Równorzędna skuteczność podczas wykonywania protokołów dla próbek o objętościach wejściowych wynoszących 2 ml i 4 ml.** Zakres liniowy wartości uzyskanych podczas wykonywania protokołu izolacji ccfDNA został określony na podstawie wyników uzyskanych dla protokołów wykorzystujących próbki o objętościach wynoszących 2 ml i 4 ml. Uzysk ccfDNA został oznaczony ilościowo przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR ukierunkowanego na sekwencję kodującą cząsteczkę 18S. Wyniki zostały obliczone jako całkowita liczba kopii na próbkę.

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

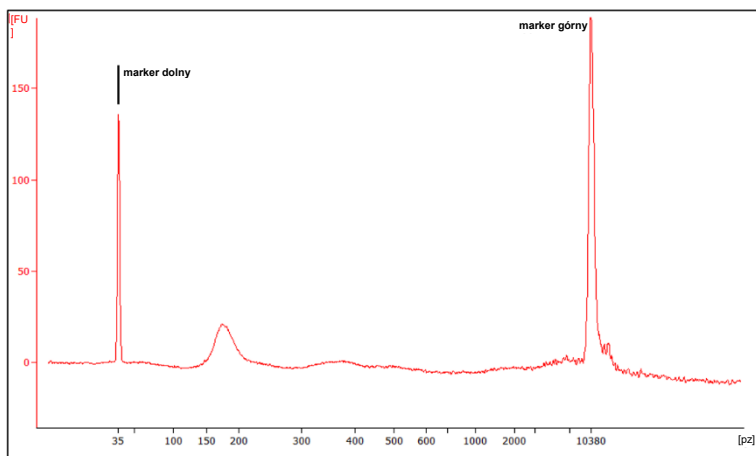
Parametr	Wartość
Szacowany stosunek średnich geometrycznych stężeń (obliczonych jako kopie/ml)	1,01
Dolna granica 95-procentowego przedziału ufności	0,92
Górna granica 95-procentowego przedziału ufności	1,11
Precyzja całkowita	14,12

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

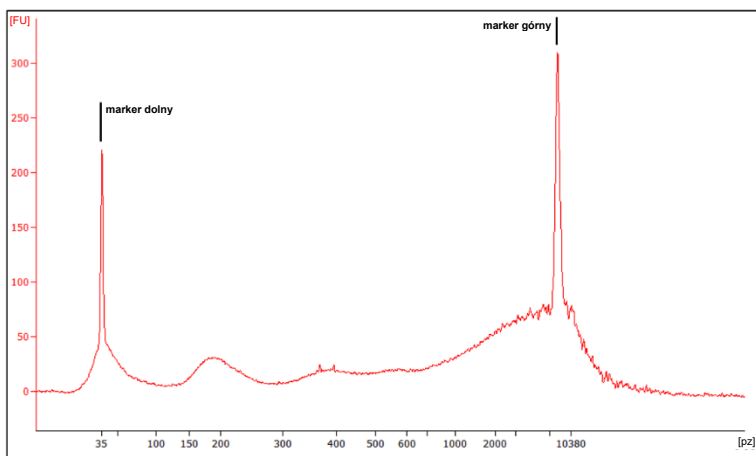
## Rozkład wielkości

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

Elektroforegram osocza widoczny na [Ryc. 4](#) przedstawia często obserwowany pik występujący przy około 165 pz, w zakresie od 145 do 196 pz, który mieści się w zakresie długości DNA wiążącego histony w nukleosomie. Elektroforegram moczu widoczny na [Ryc. 5](#) wskazuje, że dominujący pik występujący przy około 160 pz jest szerszy i mieści się w zakresie od 145 do 250 pz. Ponadto w przypadku moczu w zakresie od 20 do 100 pz (na poziomie pików dolnego markera) występuje drugi pik wskazujący na obecność frakcji ccfDNA o wyższym stopniu fragmentacji. [Ryc. 5](#) przedstawia również dużą liczbę długich fragmentów DNA o długości od około 2 kpz. Duża ilość fragmentów genomowego DNA tego typu jest często stwierdzana w próbkach moczu, najprawdopodobniej ze względu na uwalnianie genomowego DNA z komórek obecnych w moczu.



**Ryc. 4. Rozkład wielkości ccfDNA obecnego w osoczu (profil uzyskany przy użyciu aparatu Bioanalyzer).** CcfDNA został wyizolowany z próbki osocza z dodatkiem EDTA o objętości 4 ml przy użyciu zestawu QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit; 1  $\mu$ l eluatu został poddany analizie przy użyciu mikromacierzy Agilent High Sensitivity DNA Chip. Oś x — wielkość w parach zasad (pz); oś y — jednostki fluorescencji (Fluorescence Unit, FU).

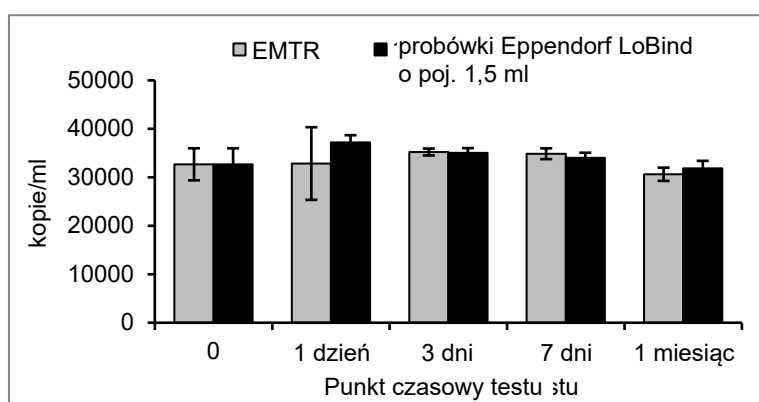


**Ryc. 5. Rozkład wielkości ccfDNA obecnego w moczu (profil uzyskany przy użyciu aparatu Bioanalyzer).** CcfDNA został wyizolowany z próbki moczu o objętości 4 ml przy użyciu zestawu QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit; 1  $\mu$ l eluatu został poddany analizie przy użyciu mikromacierzy Agilent High Sensitivity DNA Chip. Oś x — wielkość w parach zasad (pz); oś y — jednostki fluorescencji (Fluorescence Unit, FU).

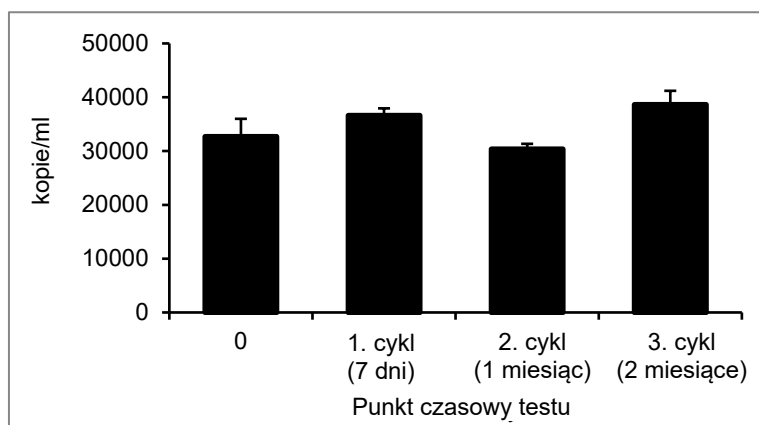
## Stabilność eluatu

Stabilność eluatu dla zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit została oceniona przy użyciu ccfDNA wyizolowanego z ludzkiej zbiorczej próbki osocza z dodatkiem EDTA. Eluaty były przechowywane w statywach elucji, w probówkach o 2 różnych formatach: probówkach QIAGEN® EMTR (Elution Microtubes CL 96; nr kat. 19588) oraz 1.5 ml Eppendorf® LoBind® Snap Cap Safe-Lock. Eluaty analizowano w powtórzeniach po 8. Stabilność DNA w eluatach została określona przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR ukierunkowanego na sekwencję kodującą cząsteczkę 18S rybosomalnego RNA.

Na stabilność eluatu przechowywanego w temperaturze 2–8°C nie miał wpływu czas przechowywania wynoszący do jednego miesiąca ani format probówki, w której był przechowywany (Ryc. 6). Na stabilność DNA w probówkach LoBind nie miało wpływu przechowywanie w temperaturze od -15°C do -30°C, które obejmowało 3 cykle zamrażania-rozmrażania wykonane odpowiednio po 7 dniach, jednym miesiącu oraz dwóch miesiącach przechowywania (Ryc. 7).



**Ryc. 6. Stabilność ccfDNA w eluatach przechowywanych w temperaturze 2–8°C w 2 formatach probówek.** CcfDNA został wyizolowany z osocza z dodatkiem EDTA przy użyciu zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit, a następnie był przechowywany w temperaturze 2–8°C przez różny czas (zastosowano różne punkty czasowe testu). Uzysk ccfDNA został oznaczony ilościowo przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR ukierunkowanego na sekwencję kodującą cząsteczkę 18S. Wyniki zostały obliczone jako liczba kopii sekwencji docelowej na mililitr wejściowej próbki osocza.



**Ryc. 7. Stabilność ccfDNA w eluatach przechowywanych w temperaturze od -15°C do -30°C, z uwzględnieniem 3 cykli zamrażania-rozmrażania.** CcfDNA został wyizolowany z osocza z dodatkiem EDTA przy użyciu zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit, a następnie był przechowywany w temperaturze od -15°C do -30°C w probówkach Eppendorf LoBind o pojemności 1,5 ml. Uzysk ccfDNA został określony względem 3 punktów czasowych testu oraz 3 cykli zamrażania-rozmrażania, przy użyciu tego samego eluatu. Uzysk ccfDNA został oznaczony ilościowo przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR ukierunkowanego na sekwencję kodującą cząsteczkę 18S. Wyniki zostały obliczone jako liczba kopii sekwencji docelowej na mililitr wejściowej próbki osocza.

## Substancje zakłócające

Do próbek ludzkiego osocza i moczu dodano różne potencjalne substancje zakłócające (patrz Tabela 3) w celu zbadania ich wpływu na skuteczność izolacji ccfDNA przy użyciu zestawu QS DSP Circulating DNA Kit oraz na zgodność z wykonywanymi następnie standardowymi dalszymi procedurami analitycznymi. Eluaty zostały przeanalizowane przy użyciu wewnętrznego oznaczenia real-time PCR ukierunkowanego na sekwencję kodującą cząsteczkę 18S oraz wysokoczułego oznaczenia dsDNA we fluorometrze Qubit® Fluorometer.

Tabela 3. Stężenia wykorzystywane w badaniu wpływu potencjalnych substancji zakłócających

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

\* CLSI EP7-A2 Vol. 25 No. 27

<sup>†</sup> FDA Draft Guidance (Wersja robocza wytycznych FDA) (11.05.2011 r.)

Nie stwierdzono, aby jakakolwiek substancja wymieniona w Tabeli 3 wykazywała wpływ zakłócający. Wyjątek stanowiły próbki osocza o wysokim stężeniu gamma-globuliny (>30 g/litr), która może spowodować obniżenie odzysku wolnokrążącego DNA.

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

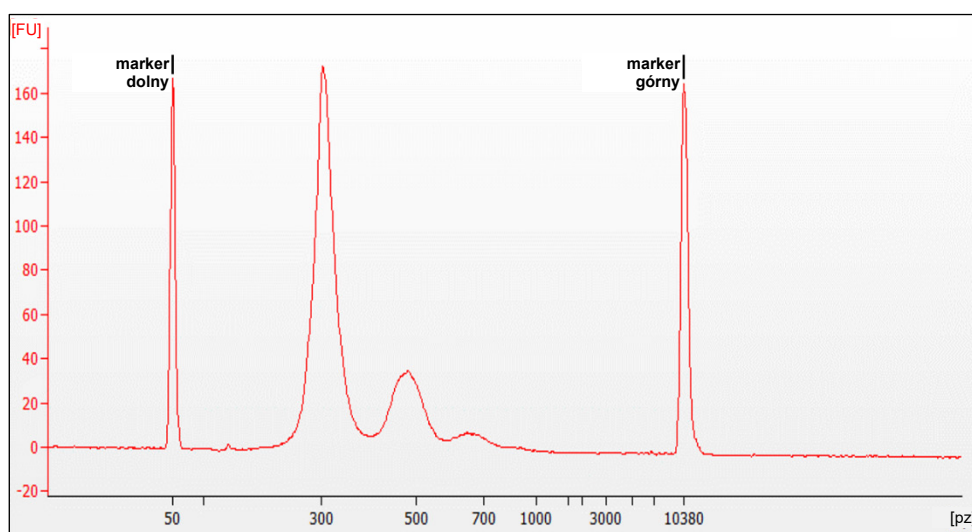
## Zanieczyszczenie krzyżowe

Zbadano ryzyko wystąpienia zanieczyszczenia krzyżowego podczas używania systemu QIASymphony DSP Circulating DNA. Na potrzeby badania wykonano trzy testy, każdy przy użyciu 96 próbek i aparatu QIASymphony SP. próbki o różnym statusie były testowane w ramach jednej partii, w której układano je naprzemiennie (naprzemiennie ułożone próbki pozytywne i negatywne). próbki osocza pobranego od kobiet (próbki negatywne) oraz próbki pobranego od kobiet osocza, do których dodano pocięte fragmenty męskiego gDNA w stężeniu 1,0E+05 kopii genu SRY1 na mililitr osocza (próbki pozytywne), zostały użyte w systemie modelowym. próbki przygotowano przy użyciu protokołu dla próbek o objętości 4 ml, który obejmuje dwa oddzielne transfery próbek o objętości 2 ml. Ryzyko wystąpienia potencjalnego zanieczyszczenia negatywnych próbek osocza pobranego od kobiet podczas procesu izolacji zostało ocenione poprzez wykonanie analizy uzyskanych eluatów przy użyciu reakcji real-time PCR ukierunkowanej na gen SRY1 swoisty dla chromosomu Y. Nie wykryto zanieczyszczenia krzyżowego spowodowanego przeniesieniem między próbkami, między partiami oraz między cyklami przetwarzania.

## Zgodność z różnymi dalszymi procedurami analitycznymi

Standardowe dalsze procedury analityczne były wykorzystywane podczas opracowywania zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit w celu wykazania zgodności wyizolowanych kwasów nukleinowych z szeregiem różnych technologii stosowanych w tych procedurach, w tym reakcji real-time PCR (patrz Ryc. 1, Ryc. 2, Ryc. 3, Ryc. 6 i Ryc. 7), fluorometrii przy użyciu aparatu Qubit Fluorometer (oznaczenie białka oraz wysoko czułe oznaczenie dsDNA), tworzenia bibliotek (patrz Ryc. 8) oraz sekwencjonowania nowej generacji (Next Generation Sequencing, NGS).

Elektroforegram na Ryc. 8 przedstawia przykład udanej ligacji do adaptera i późniejszej amplifikacji ccfDNA. Obok wyraźnego pików przy 300 pz dla nukleosomalnego ccfDNA (około 165 pz plus po około 70 pz dla poszczególnych adapterów) widoczny jest również dinukleosomalny pik przy około 470 pz.


















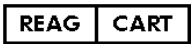
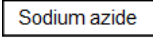


**Ryc. 8. Biblioteka DNA dla ccfDNA (jednego dawcy) wyizolowanego przy użyciu zestawu QIASymphony DSP Circulating DNA Kit.** CcfDNA został wyizolowany z osocza pobranego do próbek firmy Streck przy użyciu protokołu dla próbek o objętości 4 ml. Uzyskane 35  $\mu$ l eluatu zostało następnie przeniesione do zestawu NEBNext<sup>®</sup> Ultra DNA Library Prep Kit (Biolabs). Po amplifikacji i oczyszczeniu materiału przy użyciu produktu AMPure XP 1  $\mu$ l eluatu został przeanalizowany przy użyciu zestawu Agilent 7500 DNA Kit.



## Symbole

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

Symbol	Definicja symbolu
	Zawiera odczynniki wystarczające do wykonania <N> reakcji
	Termin ważności
	Ten produkt spełnia wymogi rozporządzenia europejskiego 2017/746 w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro.
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Numer katalogowy
	Numer serii
	Numer materiału (tj. oznaczenie składnika)
	Składniki
	Zawiera
	Numer
	Globalny numer jednostki handlowej
Rn	R oznacza wydanie Instrukcji użycia, a n to numer wydania
	Zakres temperatury
	Producent
	Zapoznać się z instrukcją użycia
	Ostrzeżenie/przestroga
	Proteinaza K
	Numer dołka (tj. dołek kasety z odczynnikami)
	Kaseta z odczynnikami
	Azydek sodu

**Symbol****Definicja symbolu**

---

<b>EtOH</b>	Etanol
<b>UDI</b>	Niepowtarzalny identyfikator wyrobu

---

## Historia zmian

### Wydanie

### Opis

R1, czerwiec 2022 r.

Wersja 2, wydanie 1

- W ramach wersji 2 zaktualizowano treść w celu zapewnienia zgodności z rozporządzeniem IVDR
- W częściach dotyczących substancji zakłócających, zanieczyszczenia krzyżowego oraz zgodności dodano informacje na temat dalszych procedur analitycznych.

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 lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®(QIAGEN Group); Cell-Free DNA Urine Preserve®, Cell-Free DNA BCT®, Streck® (Streck); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); Eppendorf®, LoBind® (Eppendorf AG); NEBNext® (New England Biolabs, Inc.); Qubit® (Thermo Fisher Scientific lub podmioty zależne). Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały wyraźnie oznaczone jako zastrzeżone, nie należy uznawać za niechronione przepisami prawa.

HB-3034-D01-001 © 2022 QIAGEN. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Strona celowo pozostawiona pusta

