

Αύγουστος 2015

# Kit QIAasymphony<sup>®</sup> DSP DNA: Χαρακτηριστικά απόδοσης

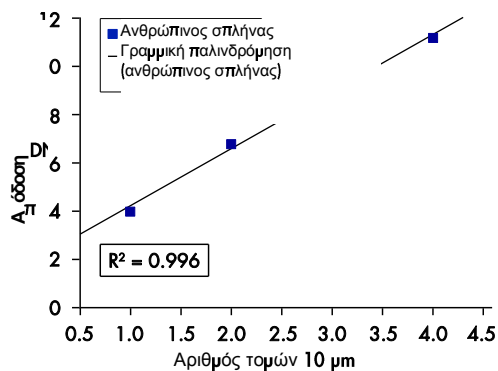
Το παρόν έγγραφο είναι το Kit QIAasymphony DSP DNA: Χαρακτηριστικά απόδοσης, R4, για kit έκδοσης 1

Τα kit QIASymphony® DSP DNA προορίζονται για χρήση μόνο σε συνδυασμό με το QIASymphony SP. Τα kit QIASymphony DSP DNA Mini παρέχουν αντιδραστήρια για τον αυτοματοποιημένο καθαρισμό ολικού DNA από ανθρώπινο ολικό αίμα, λευκοκρίτη, ιστούς και δείγματα ιστών μονιμοποιημένα με φορμαλίνη και εγκλεισμένα σε παραφίνη, καθώς και ιικό DNA από ανθρώπινο ολικό αίμα. Τα kit QIASymphony DSP DNA Midi παρέχουν αντιδραστήρια για τον αυτοματοποιημένο καθαρισμό ολικού DNA από ανθρώπινο ολικό αίμα και λευκοκρίτη

## Ιστοί και ιστοί FFPE

### Γραμμικό εύρος

Το γραμμικό εύρος για την εφαρμογή QIASymphony DSP DNA σε ιστούς FFPE αξιολογήθηκε με χρήση έξι αντιγράφων από 1–4, 10 μμ νωπές τομές FFPE ανθρώπινου σπλήνα. Για την εκχύλιση DNA χρησιμοποιήθηκε το kit QIASymphony DSP DNA Mini σε συνδυασμό με το πρωτόκολλο tissue low content DSP. Για την αποπαραφίνωση και τη λύση εφαρμόστηκε η μέθοδος προκαταρκτικής επεξεργασίας με ξυλένιο/αιθανόλη. Το DNA εκχυλίστηκε σε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης και η απόδοση DNA αξιολογήθηκε με φασματοσκοπική ανάλυση (εικόνα 1).

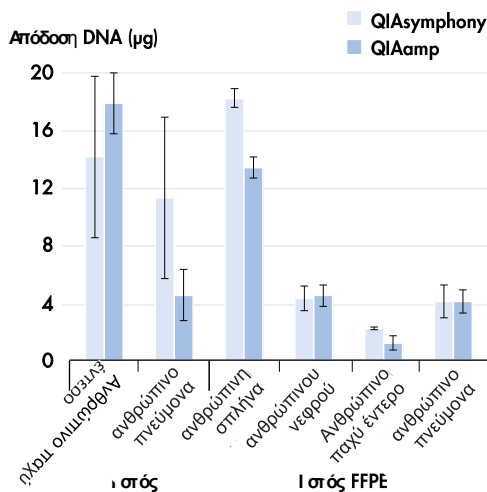


**Εικόνα 1. Γραμμικό εύρος DNA εκχυλισμένου από τομές ιστών FFPE.** Έξι αντίγραφα από 1–4, 10 μμ τομές ιστών FFPE ανθρώπινου σπλήνα υποβλήθηκαν σε αποπαραφίνωση και προκαταρκτική επεξεργασία με ξυλένιο/αιθανόλη. Η εκχύλιση DNA εκτελέστηκε στο QIASymphony SP με χρήση του kit QIASymphony DSP DNA Mini σε συνδυασμό με το πρωτόκολλο tissue low content DSP και όγκο έκλουσης 50 μl.

### Συγκριτική απόδοση

Η απόδοση του kit QIASymphony DSP DNA Mini συγκρίθηκε με την απόδοση του χειροκίνητου kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue και του kit QIAamp DSP DNA Mini με χρήση ιστού FFPE και νωπού/κατεψυγμένου ιστού, αντιστοίχως, ως υλικό αναφοράς. Οι χειροκίνητες και αυτοματοποιημένες προετοιμασίες δειγμάτων, όπως και η ποσοτικοποίηση των αποδόσεων DNA, εκτελέστηκαν ταυτοχρόνως. Στην Εικόνα 2, σελίδα 5, απεικονίζονται οι αποδόσεις DNA

μετά την εκχύλιση από νωπά/κατεψυγμένα δείγματα ιστών και δείγματα ιστών FFPE με χρήση των κιτ QIAasymphony DSP DNA Mini, QIAamp DSP DNA Mini (Tissue) και του κιτ QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (ιστός FFPE).



**Εικόνα 2. Εκχύλιση DNA από δείγματα ιστών και δείγματα ιστών FFPE.** Για νωπό/κατεψυγμένο ιστό, ανθρώπινο πνεύμονα και παχύ έντερο υποβλήθηκαν σε κοπή για τη δημιουργία 6 τεμαχίων των 25 mg. Τρία τεμάχια από κάθε τύπο ιστού χρησιμοποιήθηκαν για προετοιμασία με χρήση του QIAasymphony SP σε συνδυασμό με το πρωτόκολλο tissue high content DSP. Για την εκχύλιση DNA από τα υπόλοιπα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το κιτ QIAamp DSP DNA Mini. Το DNA εκχυλίστηκε σε 200 μl και η απόδοση DNA προσδιορίστηκε με φασματοσκοπική ανάλυση. Για την εκχύλιση DNA από ιστό FFPE, προετοιμάστηκαν 12 αντίγραφα που περιείχαν 3 x 10 μm τομές ιστών FFPE από διάφορα ανθρώπινα όργανα. Έξι δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για προετοιμασία με χρήση του QIAasymphony SP σε συνδυασμό με προκαταρτική επεξεργασία με διάλυμα αποπαραφίνωσης και το πρωτόκολλο tissue low content DSP. Για την εκχύλιση DNA από τα υπόλοιπα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το κιτ QIAamp DSP DNA FFPE Tissue. Το DNA εκχυλίστηκε σε 50 μl και η απόδοση DNA προσδιορίστηκε με φασματοσκοπική ανάλυση. Οι ράβδοι δείχνουν την απόλυτη απόδοση DNA με τυπική απόκλιση.

## Ανάλυση κατάστασης μεταλλάξεων βιολογικών δεικτών με PCR πραγματικού χρόνου

Για την ανάλυση της κατάστασης μεταλλάξεων βιολογικών δεικτών χρησιμοποιήθηκε DNA εκχυλισμένο από τομές FFPE ανθρώπινου παχέος εντέρου και DNA εκχυλισμένου από ιστικά δείγματα ανθρώπινου πνεύμονα.

Για την εκχύλιση DNA από δείγματα ιστού FFPE χρησιμοποιήθηκαν 3 x 10 μm τομές ανθρώπινου παχέος εντέρου για προετοιμασία. Η εκχύλιση DNA εκτελέστηκε με διάλυμα αποπαραφίνωσης για την προκαταρτική επεξεργασία και το πρωτόκολλο tissue low content DSP σε συνδυασμό με τον όγκο έκλουσης 100 μl. Για την ανάλυση μεταλλάξεων του βιολογικού δείκτη KRAS χρησιμοποιήθηκε το κιτ KRAS RGQ PCR σύμφωνα με το εγχειρίδιο του κιτ. Οι τιμές C<sub>T</sub> του προσδιορισμού μάρτυρα βρέθηκαν εντός του καθορισμένου εύρους και η ανάλυση

ανίχνευσης μεταλλάξεων αποκάλυψε μία υποκατάσταση αμινοξέος στο κωδικόνιο 12 (Πίνακας 5, σελίδα 6).

Για την εκχύλιση DNA από κατεψυγμένα δείγματα ιστών, χρησιμοποιήθηκαν 25 mg ανθρώπινου πνεύμονα για προετοιμασία με χρήση του πρωτοκόλλου tissue high content DSP και όγκο έκλουσης 200 μl. Εκτελέστηκε ανάλυση μεταλλάξεων του βιολογικού δείκτη EGFR. Οι προσδιορισμοί μάρτυρα και ανάλυσης μεταλλάξεων εκτελέστηκαν όπως περιγράφεται στο εγχειρίδιο του kit *therascreen*<sup>®</sup> EGFR RGQ PCR. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν μία διαγραφή εντός του γονιδίου EGFR, όπως καταδεικνύεται από τιμή  $\Delta C_T$  2,47, η οποία και υπολείπεται της καθορισμένης τιμής αποκοπής 12 για την ανίχνευση μετάλλαξης (Πίνακας 2, σελίδα 5).

**Πίνακας 2. Αποτελέσματα ανάλυσης μεταλλάξεων του βιολογικού δείκτη KRAS σε ιστό FFPE**

Δείγμα	Αντίδραση	Στόχος CT	Εσωτερικός μάρτυρας CT	$\Delta C_T^*$
Χωρίς μάρτυρα μήτρας	Μάρτυρας	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	–
Τυπικό	Μάρτυρας	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
Ιστός FFPE (ανθρώπινο παχύ έντερο)	Μάρτυρας	24.94	31.98	–
	12ALA	n.d.	32.42	–
	12ASP	n.d.	32.73	–
	12ARG	n.d.	33.05	–
	12CYS	n.d.	32.74	–
	12SER	29.11	32.34	4.17
	12VAL	n.d.	32.81	–
	13ASP	n.d.	33.20	–

\*  $\Delta C_T = M C_T - C C_T$ , where M = mutation and C = control; n.d. = not detected.

**Πίνακας 2. Αποτελέσματα ανάλυσης μεταλλάξεων του βιολογικού δείκτη EGFR σε κατεψυγμένο ιστό**

Δείγμα	Αντίδραση	Στόχος CT	Εσωτερικός μάρτυρας CT	ΔCT*
Χωρίς μάρτυρα μήτρας	Μάρτυρας	0.00	31.71	–
	T790M	0.00	32.36	–
	Διαγραφές	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	–
Τυπικό	Μάρτυρας	28.78	31.05	–
	T790M	30.08	31.13	1.30
	Διαγραφές	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
Ιστός (ανθρώπινος πνεύμονας)	Μάρτυρας	25.76	31.23	–
	T790M	n.d.	31.99	–
	Διαγραφές	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	–

\*  $\Delta C_T = M C_T - C C_T$ , όπου M = μετάλλαξη και C = μάρτυρας. δ.α. = δεν ανιχνεύθηκε

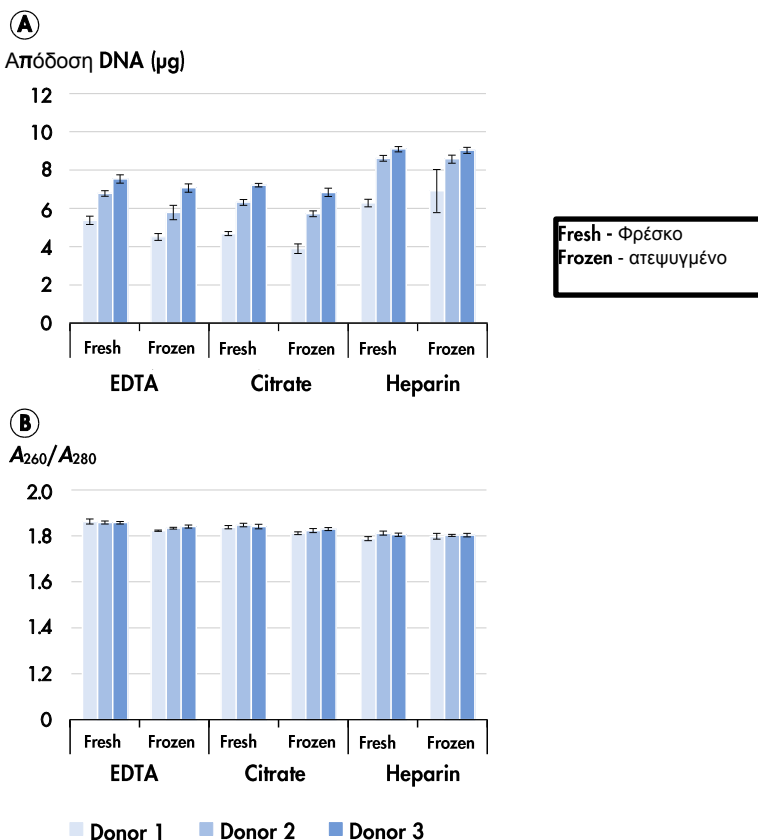
## Αίμα και λευκοκρίτης

Τα χαρακτηριστικά απόδοσης για εφαρμογές αίματος και λευκοκρίτη διενεργήθηκαν χρησιμοποιώντας δείγματα από δότες αίματος με εύρος αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων από 4,0 έως  $11,0 \times 10^6$  κύτταρα/ml και δότες λευκοκρίτη με εύρος αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων από  $2,5$  έως  $5,5 \times 10^7$  κύτταρα/ml.

## Απόδοση και καθαρότητα DNA

Η βασική απόδοση του kit QIAAsymphony DSP DNA Mini αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας διαφορετικά σωληνάρια συλλογής και αντιπηκτικά, καθώς και φρέσκο και κατεψυγμένο ανθρώπινο ολικό αίμα. Ολικό αίμα συλλέχθηκε από 3 υγιείς δότες σε 3 διαφορετικούς τύπους σωληναρίων: EDTA = BD 10 ml Vacutainer® 16 x 100 mm, K2-EDTA· Κιτρικό = BD 2,7 ml 9NC Σωληνάριο 13 x 75 mm, Κιτρικό· Ηπαρίνη = Sarstedt® 7,5 ml S-Monovette® 15 x 92 mm, Li-Ηπαρίνη. Χρησιμοποιήθηκε αίμα φρέσκο (φύλαξη στους 5°C) ή κατεψυγμένο (φύλαξη στους –20°C). Γονιδιωματικό DNA καθαρίστηκε από δείγματα των 200 μl, με 4 αντίγραφα ανά δότη και

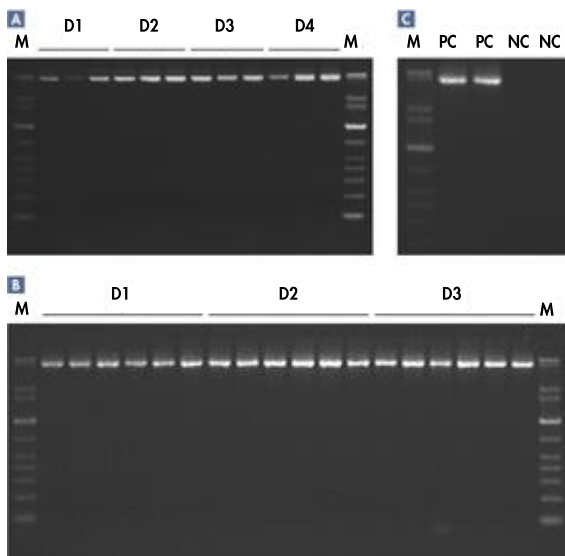
τύπο σωληναρίου, χρησιμοποιώντας το κιτ QIASymphony DSP DNA Mini και το πρωτόκολλο blood 200 DSP, με όγκο έκλουσης 200 μl. Οι αποδόσεις και η καθαρότητα DNA προσδιορίστηκαν με φασματοσκοπική ανάλυση (εικόνα 3).



Εικόνα 3. Αξιοπιστία του συστήματος χρησιμοποιώντας διαφορετικά σωληνάρια συλλογής δείγματος και αντιπηκτικά με φρέσκο και κατεψυγμένο ανθρώπινο ολικό αίμα. Α Απόδοση DNA, οι ράβδοι δείχνουν την απόλυτη απόδοση DNA με τυπική απόκλιση. Β Καθαρότητα DNA, οι ράβδοι δείχνουν την καθαρότητα DNA με τυπική απόκλιση.

## Ακεραιότητα DNA

Προϊόντα PCR για την ενίσχυση μεγάλων τμημάτων DNA (5 kb) ενισχύθηκαν χρησιμοποιώντας το κιτ QIAGEN LongRange PCR (αντίδραση 50 μl). (εικόνα 4, σελίδα 7).



**Εικόνα 4. Ακεραιότητα DNA ελεγμένη με PCR για την ενίσχυση μεγάλων τμημάτων DNA.** **A** Ολικό αίμα συλλέχθηκε από 4 υγιείς δότες (D) σε σωληνάρια BD K2E. Γονιδιωματικό DNA για PCR για την ενίσχυση μεγάλων τμημάτων DNA καθαρίστηκε από υποπολλαπλάσια των 200 μl εις τριπλούν, χρησιμοποιώντας το kit QIAasymphony DSP DNA Mini και το πρωτόκολλο blood 200 DSP, με όγκο έκλουσης 200 μl. D1 = Δότης 1, D2 = Δότης 2, D3 = Δότης 3 και D4 = Δότης 4. **B** Ολικό αίμα συλλέχθηκε από 3 υγιείς δότες σε σωληνάρια BD K2E και παρασκευάστηκε λευκοκρίτης. Γονιδιωματικό DNA καθαρίστηκε από υποπολλαπλάσια των 200 μl σε έξι αντίγραφα, χρησιμοποιώντας το kit QIAasymphony DSP DNA Mini και το πρωτόκολλο buffy coat 200 DSP, με όγκο έκλουσης 200 μl. D1 = Δότης 1, D2 = Δότης 2 και D3 = Δότης 3. **Γ** Μάρτυρες: PC = θετικός μάρτυρας NC = αρνητικός μάρτυρας.

## Επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα

Για την εκχύλιση DNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο blood 200 DSP, χρησιμοποιώντας όγκο έκλουσης 200 μl. Η επαναληψιμότητα αξιολογήθηκε από έναν μόνο χειριστή που πραγματοποίησε τρεις ανεξάρτητες εκτελέσεις (96 δείγματα έκαστη) σε τρεις διαφορετικές ημέρες, με κάθε εκτέλεση αποτελούμενη από 4 παρτίδες των 24 δειγμάτων (Πίνακες 3 και 4, σελίδα 8).

Η αναπαραγωγιμότητα αξιολογήθηκε με την πραγματοποίηση τριών ανεξάρτητων εκτελέσεων (96 δείγματα έκαστη) σε τρεις διαφορετικές ημέρες, από τρεις διαφορετικούς χειριστές σε διαφορετικά όργανα QIAasymphony SP, με κάθε εκτέλεση αποτελούμενη από 4 παρτίδες των 24 δειγμάτων (Πίνακες 5 και 6, σελίδες 8 και 9).

**Πίνακας 3. Αποτελέσματα της αξιολόγησης επαναληψιμότητας**

Εκτέλεση	Παρτίδα	N	Μέση απόδοση DNA (μg)	TA	ΣΔ
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
Σύνολο	–	288	4,96	–	–

\* N = αριθμός αντιγράφων, TA = τυπική απόκλιση, ΣΔ = συντελεστής διακύμανσης.

**Πίνακας 4. Δεδομένα ακρίβειας για την αξιολόγηση επαναληψιμότητας**

	TA	ΣΔ
Από παρτίδα σε παρτίδα, εντός της ίδιας εκτέλεσης	0,25	4,95
Γενική ακρίβεια επανάληψης	0,26	5,18

\* TA = τυπική απόκλιση, ΣΔ = συντελεστής διακύμανσης.

**Πίνακας 5. Αποτελέσματα της αξιολόγησης αναπαραγωγιμότητας.**

Εκτέλεση	Παρτίδα	N	Μέση απόδοση DNA (μg)	TA	ΣΔ
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
Σύνολο	–	288	5,38	–	–

\* N = αριθμός αντιγράφων, TA = τυπική απόκλιση, ΣΔ = συντελεστής διακύμανσης.

**Πίνακας 6. Δεδομένα ακρίβειας για την αξιολόγηση αναπαραγωγιμότητας**

	TA	ΣΔ

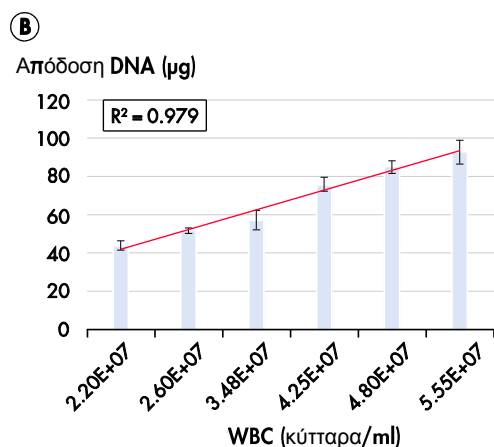
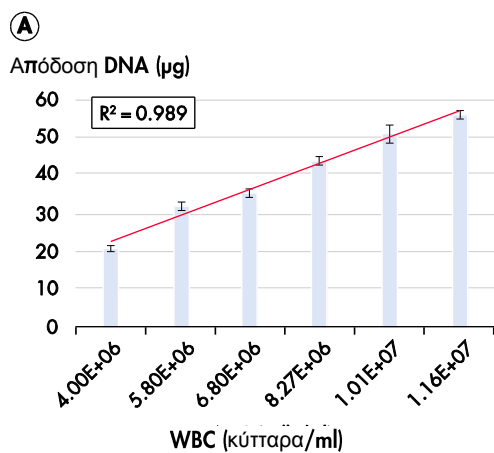


	ΤΑ	ΣΔ
Από παρτίδα σε παρτίδα, εντός της ίδιας εκτέλεσης	0,25	4,73
Γενική ακρίβεια επανάληψης	0,38	7,03

\* ΤΑ = τυπική απόκλιση, ΣΔ = συντελεστής διακύμανσης.

## Γραμμικό εύρος

Τα γραμμικά εύρη για τις εφαρμογές QIASymphony DSP DNA αίματος και λευκοκρίτη αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας δείγματα αίματος και λευκοκρίτη με έξι διαφορετικούς αριθμούς λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) για κάθε τύπο δείγματος. Για ολικό αίμα, οι αριθμοί WBC κυμάνθηκαν από  $4 \times 10^6$  κύτταρα/ml έως  $11,6 \times 10^6$  κύτταρα/ml και για λευκοκρίτη, οι αριθμοί κυμάνθηκαν από  $2,2 \times 10^7$  κύτταρα/ml έως  $5,6 \times 10^7$  κύτταρα/ml. Οι αποδόσεις DNA αξιολογήθηκαν με φασματοσκοπική ανάλυση και σχεδιάστηκαν έναντι του αριθμού WBC (εικόνα 5).

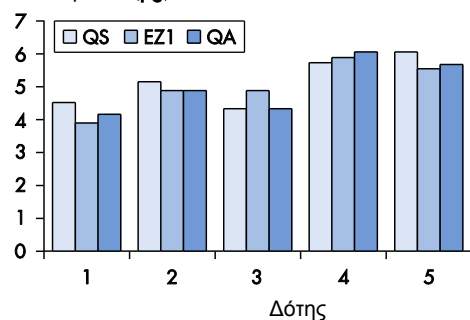


**Εικόνα 5. Γραμμικό εύρος DNA εκχυλισμένου από αίμα και λευκοκρίτη** Α Γονιδιωματικό DNA καθαρίστηκε από 1 ml ανθρώπινου ολικού αίματος χρησιμοποιώντας το κιτ QIASymphony DSP DNA Midi και το πρωτόκολλο blood 1000 DSP, με όγκο έκλουσης 500 μl. Οι ράβδοι δείχνουν την απόλυτη απόδοση DNA με τυπική απόκλιση. Β Γονιδιωματικό DNA καθαρίστηκε από 400 μl λευκοκρίτη χρησιμοποιώντας το κιτ QIASymphony DSP DNA Midi και το πρωτόκολλο buffy coat 400 DSP, με όγκο έκλουσης 400 μl. Οι ράβδοι δείχνουν την απόλυτη απόδοση DNA με τυπική απόκλιση.

## Συγκριτική απόδοση

Η απόδοση αναλύθηκε για το σύστημα QIASymphony DSP DNA αίματος σε σύγκριση με το σύστημα EZ1<sup>®</sup> DSP DNA αίματος και τη χειροκίνητη διαδικασία προετοιμασίας του κιτ QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini. DNA καθαρίστηκε από διαφορετικά δείγματα αίματος, αναλύθηκε για απόδοση DNA (εικόνα 6) και χρησιμοποιήθηκε στη σημασμένη με CE ανάλυση με το κιτ *artus*<sup>®</sup> MTHFR LC PCR (24) CE (Πίνακας 7, σελίδα 12).

Απόδοση DNA (μg)



**Εικόνα 6. Σύγκριση των αποδόσεων DNA μεταξύ διαφορετικών συστημάτων καθαρισμού DNA αίματος.** Ολικό αίμα συλλέχθηκε από 5 υγιείς δότες σε σωληνάρια BD K2E. Για όλες τις μεθόδους, χρησιμοποιήθηκαν όγκοι εισαγωγής δείγματος 200 μl και όγκοι έκλυσης 200 μl.

QS = κιτ QIAAsymphony DSP DNA Mini και πρωτόκολλο blood 200 DSP; EZ1 = EZ1 Advanced XL με χρήση του κιτ EZ1 DSP DNA Blood• QA = Κιτ QIAamp DNA Blood Mini. Οι ράβδοι δείχνουν την απόλυτη απόδοση DNA για κάθε δείγμα.

**Πίνακας 7. Πολυμορφισμοί στο νουκλεοτίδιο (nt) 667 και nt 1298 του γονιδίου MTHFR μέσω ανίχνευσης με χρήση του κιτ artus MTHFR LC PCR**

Donor	Method	nt 677	nt 1298	Genotype result
1	QS	Homozygous wt wt677/wt677	Heterozygous variant wt1298/var1298	wt677/wt677 wt1298/var1298 heterozygous variant
	EZ1	Homozygous wt wt677/wt677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
	QA	Homozygous wt wt677/wt677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
2	QS	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	wt677/var677 wt1298/var1298 heterozygous variant
	EZ1	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
	QA	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
3	QS	Homozygous wt wt677/wt677	Heterozygous variant wt1298/var1298	wt677/wt677 wt1298/var1298 heterozygous variant
	EZ1	Homozygous wt wt677/wt677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
	QA	Homozygous wt wt677/wt677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
4	QS	Homozygous variant var677/var677	Homozygous wt wt1298/wt1298	var677/var677 wt1298/wt1298 homozygous variant
	EZ1	Homozygous variant var677/var677	Homozygous wt wt1298/wt1298	
	QA	Homozygous variant var677/var677	Homozygous wt wt1298/wt1298	
5	QS	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	wt677/var677 wt1298/var1298 heterozygous variant
	EZ1	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
	QA	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	

Donor	Method	nt 677	nt 1298	Genotype result
6	QS	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	wt677/var677 wt1298/var1298 heterozygous variant
	EZ1	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
	QA	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
7	QS	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygous wt wt1298/wt1298	wt677/wt677 wt1298/wt1298 homozygous wild-type
	EZ1	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygous wt wt1298/wt1298	
	QA	Homozygous wt wt677/wt677		
8	QS	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygous wt wt1298/wt1298	wt677/wt677 wt1298/wt1298 homozygous wild-type
	EZ1	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygous wt wt1298/wt1298	
	QA	Homozygous wt wt677/wt677		
9	QS	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	wt677/var677 wt1298/var1298 heterozygous variant
	EZ1	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
	QA	Heterozygous variant wt677/var677	Heterozygous variant wt1298/var1298	
10	QS	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygous wt wt1298/wt1298	wt677/wt677 wt1298/wt1298 homozygous wild-type
	EZ1	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygous wt wt1298/wt1298	
	QA	Homozygous wt wt677/wt677	Homozygous wt wt1298/wt1298	

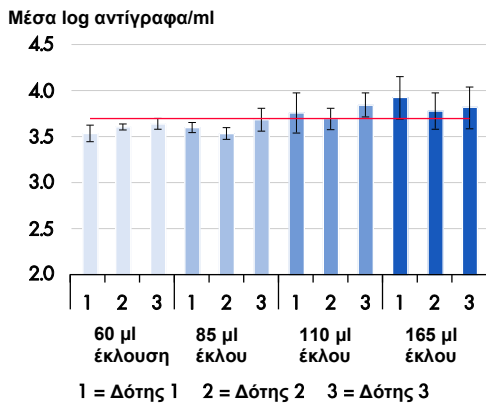
Η γενετική διακρίμανση του γονιδίου μεθυλενοτετραϋδροφολικής αναγωγής (MTHFR) αναλύθηκε σε δύο θέσεις νουκλεοτιδίων (nt 677 και nt 1298) μέσω ανάλυσης καμπύλης τήξης σε ένα όργανο LightCycler®. Ολικό αίμα συλλέχθηκε από 10 υγιείς δότες σε σωληνάρια BD K2E. Για όλες τις μεθόδους, χρησιμοποιήθηκαν όγκοι εισαγωγής δείγματος 200 μl και όγκοι έκλουσης 200 μl. QS = κιτ QIAasymphony DSP DNA Mini και πρωτόκολλο blood 200 DSP; • EZ1 = EZ1 Advanced XL με χρήση του κιτ EZ1 DSP DNA Blood• QA = Κιτ QIAamp DNA Blood Mini. wt = αλληλόμορφο αγρίου τύπου (wild-type) στην αντίστοιχη θέση του γονιδίου MTHFR• var = παραλλαγμένο αλληλόμορφο στην αντίστοιχη θέση του γονιδίου MTHFR.

## Ιικές εφαρμογές αίματος

Τα χαρακτηριστικά απόδοσης για ιικές εφαρμογές αίματος διενεργήθηκαν χρησιμοποιώντας δείγματα από δότες αίματος με εύρος αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων από 4,0 έως 11,0 x 10<sup>6</sup> κύτταρα/ml.

### Ανάκτηση ιικού DNA

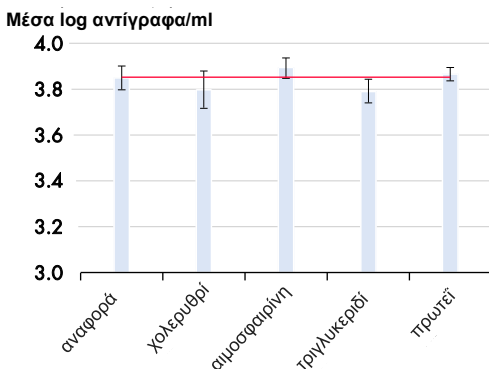
Ολικό αίμα συλλέχθηκε από 3 υγιείς δότες σε σωληνάρια BD K2E και εμπλουτίστηκε με πρότυπο υλικό CMV (τίτλος 3,7 log αντίγραφα/ml). Ιικό DNA καθαρίστηκε από 7 αντίγραφα, ένασσο με χρήση του κιτ QIAasymphony DSP DNA Mini και του πρωτοκόλλου virus blood 200 DSP, με 4 διαφορετικούς όγκους έκλουσης (εικόνα 7).



**Εικόνα 7. Σύγκριση της ποσοτικοποίησης ιικού DNA για διαφορετικούς όγκους έκλουσης** Εκλούσματα από κάθε δείγμα δότη και όγκο έκλουσης (60 μl, 85 μl, 110 μl και 165 μl) αναλύθηκαν με το kit *artus* CMV RG PCR. Η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύει τον τίτλο στόχο και οι ράβδοι δείχνουν τα μέσα log αντίγραφα ανά χιλιοστόλιτρο με τυπική απόκλιση.

## Αναχαιτιστικές ουσίες

Η επίδραση αναχαιτιστικών ουσιών, οι οποίες μπορεί να είναι παρούσες στο ολικό αίμα, στην απόδοση του πρωτοκόλλου *virus blood 200 DSP* ελέγχθηκε με την προσθήκη Για αιμοσφαιρίνη (200 g/l) και πρωτεΐνη (120 g/l), προσδιορίστηκαν τα υπάρχοντα επίπεδα στο δείγμα αίματος και προστέθηκε πρόσθετη αιμοσφαιρίνη ή πρωτεΐνη για να επιτευχθούν οι υποδεικνυόμενες συγκεντρώσεις, 200 g/l ή 120 g/l, αντίστοιχα. Για χολερυθρίνη (200 mg/l) και τριγλυκερίδια (30 g/l), προστέθηκε στα δείγματα η συνολική ποσότητα κάθε ουσίας για να επιτευχθούν οι υποδεικνυόμενες συγκεντρώσεις.



**Εικόνα 8. Δοκιμασία αναχαιτιστικών ουσιών.** Ολικό αίμα συλλέχθηκε από 1 υγιή δότη σε σωληνάρια BD K2E και εμπλουτίστηκε με πρότυπο ολικό CMV (τίτλος 4,0 log αντίγραφα/ml). Εξετάστηκαν πέντε δείγματα με την προσθήκη πιθανών αναχαιτιστικών ουσιών και το ιικό DNA καθαρίστηκε από τέσσερα αντίγραφα κάθε δείγματος χρησιμοποιώντας το

κιτ QIAAsymphony DSP DNA Mini και το πρωτόκολλο DSP Virus Blood 200, με όγκο έκλουσης 165 µl. Τα εκλούσματα αναλύθηκαν με το κιτ artus CMV RG PCR. Η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύει τον προσδιορισμένο τίτλο για τα δείγματα αναφοράς, τα οποία δεν εμπλουτίστηκαν με καμία αναχαιτιστική ουσία, και οι ράβδοι δείχνουν τα μέσα log αντίγραφα ανά χιλιοστόλιτρο με τυπική απόκλιση.

## Ευαισθησία

Μελέτες λόγου ευστοχίας διενεργήθηκαν με την αραίωση προ-ποσοτικοποιημένου πρότυπου υλικού CMV κατά Π.Ο.Υ. σε CMV-αρνητικό ανθρώπινο ολικό αίμα. Ποσοστό ανίχνευσης 100% παρατηρήθηκε για δείγματα με ιικά φορτία 90 IU CMV ανά χιλιοστόλιτρο.

**Πίνακας 8. Ευαισθησία της εφαρμογής QIAAsymphony DSP Virus Blood**

CMV (IU/ml)	Αντίγραφα	Ευστοχίες	Ευστοχία %
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

Ανθρώπινο ολικό αίμα συλλέχθηκε από 1 υγιή CMV-αρνητικό δότη σε σωληνάρια BD K2E και εμπλουτίστηκε με πρότυπο υλικό CMV κατά Π.Ο.Υ. χρησιμοποιώντας διαφορετικούς τίτλους. Ιικό DNA καθαρίστηκε χρησιμοποιώντας το κιτ QIAAsymphony DSP DNA Mini και το πρωτόκολλο DSP Virus Blood 200, με όγκο έκλουσης 60 µl. Τα εκλούσματα αναλύθηκαν με το κιτ artus CMV RG PCR.

Για τις τρέχουσες πληροφορίες άδειας και αποποιήσεις σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο ή οδηγίες χρήσης του κιτ QIAGEN. Τα εγχειρίδια ή οι οδηγίες χρήσης των κιτ QIAGEN είναι διαθέσιμα στη διεύθυνση [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από το Τμήμα τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAAsymphony®, artus®, EZ1®, theascreer® (QIAGEN Group); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.); BD™, Vacutainer®, (Becton Dickinson and Company); LightCycler® (Roche Group). Οι καταχωρημένες ονομασίες, τα εμπορικά σήματα κ.λ.π. που χρησιμοποιούνται σε αυτό το έγγραφο, δεν θα πρέπει να θεωρούνται μη προστατευμένα από το νόμο, ακόμη και αν δεν επισημαίνονται ειδικά ως τέτοια. 08/2015 HB-0977-D01-004  
© 2012–2015 QIAGEN, με την επιφύλαξη κάθε δικαιώματος.

