




Charakteristiky funkčních vlastností

QIAamp® DSP Circulating NA Kit, verze 1 REF 61504

Správa verzí

  	Před samotným testem si ověřte dostupnost nových revizí elektronického značení na adrese www.qiagen.com pod číslem výrobku a zdroji produktů.
---	--

Obecný úvod

Souprava QIAamp DSP Circulating NA Kit je systém, který k izolaci a purifikaci cirkulující nebuněčné (circulating cell-free, ccf) DNA a RNA ze vzorků lidské krevní plazmy používá technologii silikátové membrány (technologie QIAamp).

Tento produkt je určen pro použití profesionálními uživateli, např. techniky a lékaři, vyškolenými v technikách molekulární biologie.

Souprava QIAamp DSP Circulating NA Kit je určena pro diagnostické účely in vitro.

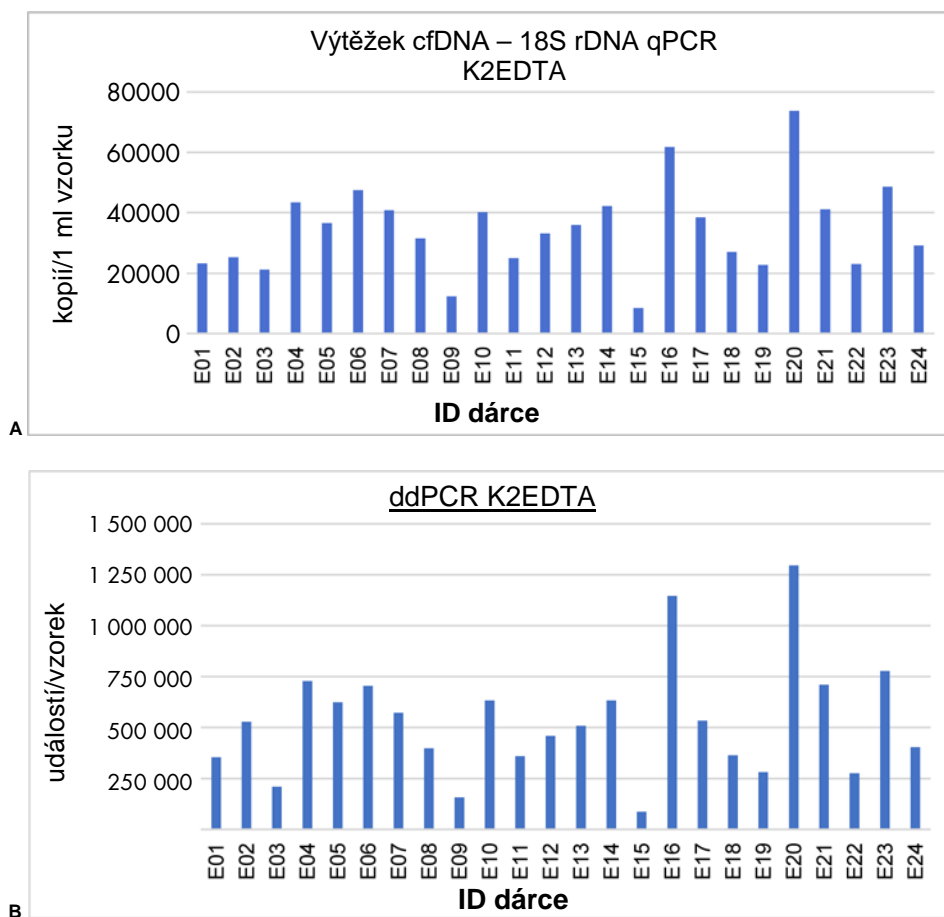
Výtěžek purifikovaných nukleových kyselin (Nucleic Acids, NA)

Vzorky plazmy mohou, pokud jde o výtěžek purifikovaných nukleových kyselin, vykazovat vysoké odchylky. Proto je nutné, aby uživatelé vstupní plasmu a eluční objem pro svůj konkrétní cíl a následné použití v laboratoři optimálně upravili.

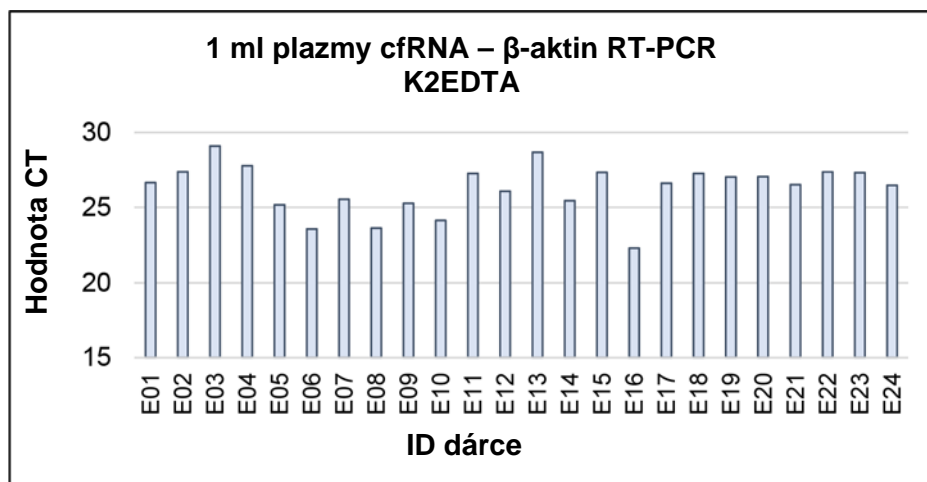
Pokud se tato souprava používá spolu s následnou aplikací QIAGEN®, pokyny najdete v příslušné příručce.

Analýza následných aplikací

Nukleové kyseliny izolované pomocí soupravy QIAamp DSP Circulating NA Kit jsou připraveny k použití v různých následných aplikacích. Pro vyhodnocení vlastností byly izolovány nukleové kyseliny z lidské plazmy jednoho dárce pomocí tří různých odběrových zkumavek (BD Vacutainer® K2EDTA Tube, Becton Dickinson®; PAXgene® Blood ccfDNA Tube, PreAnalytiX; a Streck® Cell-Free DNA Blood Collection Tube (BCT)®, Streck; vždy n=24 dárců). Eluáty ze vstupní plazmy o objemu 1 ml byly testovány pomocí kvantitativní PCR (quantitative PCR, qPCR, obrázek 1A), kapkové digitální PCR (digital droplet PCR, ddPCR, obrázek 1B) a qPCR s reverzní transkripcí (reverse transcription qPCR, RT-qPCR) pro RNA (jen zkumavka na plazmu BD Vacutainer K2EDTA Tube, obrázek 2).



Obrázek 1. Srovnání plazmy jednoho dárce (vstup 1 ml) mezi qPCR a ddPCR (Bio-Rad®)



Obrázek 2. Detekce bezbuněčné RNA v plazmě jednoho dárce (vstup 1 ml) pomocí analýzy qPCR s reverzní transkripcí pro lidský β -aktinový gen (délka fragmentu 293 bp).

Pro analýzu sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing, NGS) byly vytvořeny eluáty ze vstupního objemu plazmy 5 ml (zkumavka BD Vacutainer K2EDTA Tube, zkumavka PAXgene Blood ccfDNA Tube a Streck Cell-Free DNA BCT; vždy n = 8 dárců). Celkový výtěžek DNA z 5 ml plazmy se pohyboval v rozsahu 50–150 ng DNA zjištěné pomocí analýzy Qubit® HS dsDNA. Analýza NGS byla provedena pomocí panelu GeneRead® QIAact Actionable Insights Tumor Panel a systému GeneReader™. Všechny vzorky byly úspěšně obohaceny a byly vytvořeny knihovny. K lidskému genomu bylo zmapováno >98 % vygenerovaných odečtů a >99,8 % pozic v oblastech zájmu mělo pokrytí základny $\geq 500\times$.

U obou druhů nukleových kyselin (DNA a RNA) se prokázalo úspěšné použití následných technologií (Obrázek 3)

	qPCR	ddPCR	RT-qPCR	NGS
K2EDTA	✓	✓	✓	✓
PAXgene	✓	✓	netestováno	✓
Streck	✓	✓	netestováno	✓

Obrázek 3. Úspěšné použití izolovaných nukleových kyselin s různými následnými aplikacemi.

Uživatel by měl vstup plazmy a eluční objem optimalizovat pro vlastní cílovou molekulu a jakékoli následné postupy používané v laboratoři nebo si vyhledat specifické funkční vlastnosti příslušné následné aplikace.

Stabilita eluátů

Stabilita eluátů bude záviset na obsahu a typu izolovaných nukleových kyselin, elučním objemu a podmínkách skladování. Doporučujeme, aby uživatelé stanovili eluční stabilitu dle potřeby pro jejich konkrétní požadavky.

Eluční stabilita byla testována pro DNA a eluáty získané z lidské plazmy získané ze zkumavky BD Vacutainer K2EDTA Tube (Becton Dickinson) a stabilizačních zkumavek pro odběr krve (PAXgene Blood ccfDNA Tube a Streck Cell-Free DNA BCT). Eluáty byly skladovány při teplotě od -30 do -15 °C a od -90 do -65 °C. Po dobu až 12 měsíců nebylo pozorováno žádné poškození. Eluáty skladované při teplotě 2 – 8 °C a při pokojové teplotě (15 – 25 °C) byly stabilní po dobu až 48 hodin. Všechny podmínky byly posouzeny pomocí qPCR cílené na lidský gen 18S rDNA.

Stabilita eluátů byla testována na RNA a eluáty získané z lidské plazmy byly získány ze zkumavek BD Vacutainer K2EDTA Tube (Becton Dickinson). Eluáty byly skladovány při teplotě od -30 do -15 °C a od -90 do -65 °C. Po dobu až 6 měsíců nebylo pozorováno žádné poškození. Eluáty skladované při teplotě 2 – 8 °C byly stabilní po dobu až 48 hodin. Všechny podmínky byly posouzeny pomocí RT-qPCR cílené na lidský β -aktinový gen.

Pokud se tato souprava používá spolu s následnými aplikacemi QIAGEN, pokyny naleznete v příslušné příručce soupravy.

Přesnost izolace nukleových kyselin (Nucleic Acids, NA)

Přesnost byla vyhodnocena pomocí lidské plazmy a podmínky byly posouzeny pomocí qPCR cílené na lidský gen 18S rDNA.

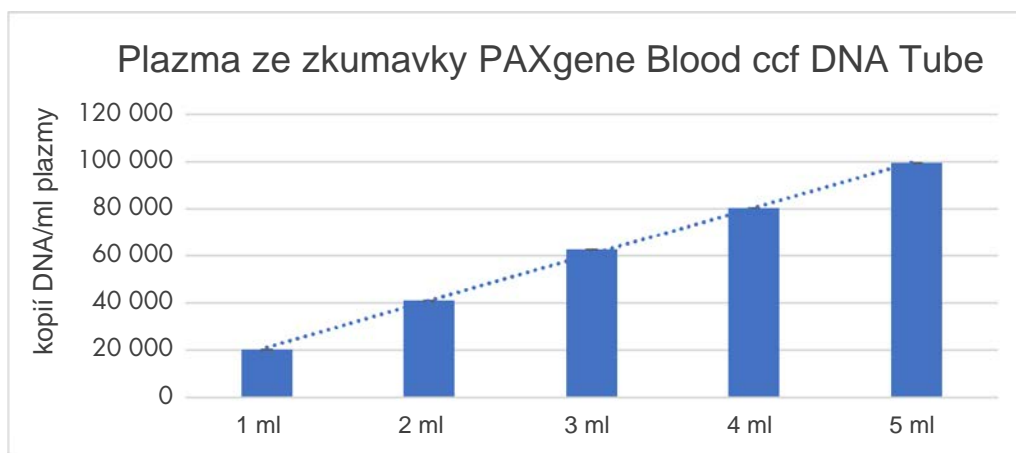
Nastavení experimentu zahrnovalo 12 cyklů purifikace s 12 opakováními na každý z nich (celkem 144 purifikací). Cykly purifikace byly provedeny třemi různými pracovníky obsluhy ve třech různých dnech se třemi různými přístroji a pomocí tří různých šarží soupravy QIAamp DSP Circulating NA Kit. Pro každý jednotlivý parametr a pro celkovou variabilitu (celkem) soupravy QIAamp DSP Circulating NA Kit byly stanoveny směrodatná odchylka (Standard Deviation, SD) a variační koeficient (Coefficient of Variation, CV) (tabulka 1).

Tabulka 1. Přesnost výsledků

Přesnost			
Parametr	Střední kopie /ml	SD	CV (%)
Mezi zpracováními	25894	461	1,78
Mezi pracovníky obsluhy		1392	5,38
Mezi přístroji		228	0,88
Mezi dny		2096	8,09
Mezi šaržemi		969	3,74
Celkem		3120	12,05

Linearita

Údaje byly získány pro vstupní objem plazmy 1–5 ml z krve skladované ve zkumavkách BD Vacutainer K2EDTA Tube, PAXgene Blood ccfDNA Tube a zkumavkách pro odběr krve Streck Cell-Free DNA BCT. U všech zkumavek pro odběr krve byl pozorován lineární nárůst výtěžku DNA (viz obrázek 4); u zkumavek BD Vacutainer K2EDTA Tube došlo i k nárůstu výtěžku RNA.



Obrázek 4. Lineární nárůst celkového výtěžku DNA (kopie DNA/ml vstupní plazmy) pro různé vstupní objemy plazmy. Zobrazeny jsou údaje pro plazmu získané ze zkumavky PAXgene Blood ccfDNA Tube, ekvivalentní výsledky získané ze zkumavky BD Vacutainer K2EDTA Tube (DNA/RNA) a zkumavky pro odběr krve Streck Cell-Free DNA BCT.

Protokol ekvivalence (Breeze/klasické protokoly)

Ekvivalence vlastností mezi protokolem Breeze a klasickým protokolem byla stanovena prokázáním, že příslušná 95% limit spolehlivosti rozdílu střední hodnoty Ct (RNA) nebo středních kopií/ml (DNA) byla v rozmezí $\pm 2 \times \text{SD}$, přičemž standardní odchylka (Standard Deviation, SD) byla pozorovaná přesnost klasického protokolu (referenční podmínka). Použity byly tři šarže souprav a experimenty provedli tři pracovníci obsluhy.

Celková přesnost (SD) hodnot Ct získaných pro protokol Breeze byla nižší než horní limit dvoustranného 95% intervalu predikce pro celkovou přesnost (SD) klasického protokolu, přičemž interval predikce byl vypočítán v rámci studie, která používala údaje z klasického protokolu (n=143) a s počtem datových bodů pro protokol Breeze (n=144) ve studii.

Interferující látky

Případné interferující látky mohou pocházet z různých zdrojů, např. přirozených metabolitů, látek zavlečených během ošetření pacienta nebo látek, které pacient požil. U soupravy QIAamp DSP Circulating NA Kit byly jako endogenní složky testovány hemoglobin, triglyceridy, EDTA, kofein, albumin, konjugovaný bilirubin a nekonjugovaný bilirubin. Při použití qPCR jako následné aplikace nebyla zjištěna žádná interference. Během zpracování vzorků a extrakce nukleových kyselin rovněž nebyla pozorována žádná interference vlivem komponentů soupravy QIAamp DSP Circulating NA Kit (proteináza K, pufrý Buffer ACL, Buffer ACB, Buffer ACW1, Buffer ACW2 a etanol).

Vzhledem ke složitosti potenciálně interferujících látek a různé citlivosti konkrétních následných aplikací doporučujeme, aby uživatelé posoudili vliv interferujících látek specifický pro jejich vlastní pracovní postup a metodu validovali na řízení interference ve své konkrétní diagnostické následné aplikaci.

Další informace o interferujících látkách v konkrétních následných aplikacích QIAGEN® najdete v příručkách příslušných souprav.

Křížová kontaminace

Pro posouzení úrovně křížové kontaminace bylo do 5 ml nebo 2 ml lidské krevní plazmy doplněno 10^5 kopií viru HBV (pozitivní vzorky) a v šachovnicovém uspořádání byly izolovány vedle vzorků bez viru (negativní vzorky), přičemž se střídaly s extrakčními cykly obsahujícími pouze negativní vzorky (pro posouzení křížové kontaminace v rámci extrakčního cyklu a mezi jednotlivými extrakčními cykly). Cílem studie bylo simulovat situaci, při které mohou vzorky obsahující vysokou hladinu cílových molekul nukleové kyseliny během postupu extrakce křížově kontaminovat jiné vzorky. Purifikace NA byla provedena pomocí jedné šarže činidel. Křížová kontaminace byla posouzena pomocí soupravy *artus*® HBV RG CE PCR Kit. Výsledky prokázaly, že v celém systému nedošlo k žádné křížové kontaminaci.

Poznámky

Historie revizí

Datum	Změny
R1 09/2019	První vydání
R2 08/2021	Revidovány podmínky skladování pro stabilitu eluátů testovaných na DNA: Skladování při teplotách –30 až –15 °C a –90 až –65 °C je možné po dobu až 12 měsíců. Revidovány podmínky skladování pro stabilitu eluátů testovaných na RNA: Skladování při teplotách –30 až –15 °C a –90 až –65 °C je možné po dobu až 6 měsíců. Opravena chyba v listu s charakteristikami: Skladování RNA při pokojové teplotě (15–25 °C) nebylo testováno. Opraveny údaje ze studie přesnosti ve sloupcích SD a CV v tabulce 1.

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro soupravu QIAGEN nebo uživatelské příručce. Příručky k soupravám QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na stránkách **www.qiagen.com** nebo si je lze vyžádat od technických služeb společnosti QIAGEN nebo místního distributora.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, artus®, GeneRead®, GeneReader™ (QIAGEN Group); BD Vacutainer®, Becton Dickinson® (Becton Dickinson and Co.); Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); PAXgene® (PreAnalytix GmbH); Streck®, Cell-Free DNA BCT® (Streck Inc.); Qubit® (Thermo Fisher Scientific nebo její přidružené společnosti).

HB-0466-D01-002 © 2021 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

