




Χαρακτηριστικά επιδόσεων

QIAamp® DSP Circulating NA Kit, Έκδοση 1 **REF** 61504

Διαχείριση εκδόσεων

  	Ελέγξτε τη διαθεσιμότητα νέων ηλεκτρονικών αναθεωρήσεων επισήμανσης στη διεύθυνση www.qiagen.com , κάτω από τις καρτέλες «Product Number» (Αριθμός προϊόντος) και «Product Resources» (Πόροι προϊόντος) προτού εκτελέσετε τη δοκιμασία.
---	--

Γενική εισαγωγή

Το QIAamp DSP Circulating NA Kit είναι ένα σύστημα που χρησιμοποιεί τεχνολογία μεμβράνης πυριτίου (τεχνολογία QIAamp) για την απομόνωση και τον καθαρισμό κυκλοφορούντος, ελεύθερου κυττάρων (circulating cell-free, ccf) DNA και RNA από δείγματα ανθρώπινου πλάσματος αίματος.

Το προϊόν προορίζεται για χρήση από επαγγελματίες, όπως τεχνολόγους και ιατρούς που έχουν εκπαιδευτεί σε τεχνικές μοριακής βιολογίας.

Το QIAamp DSP Circulating NA Kit προορίζεται για in vitro διαγνωστική χρήση.

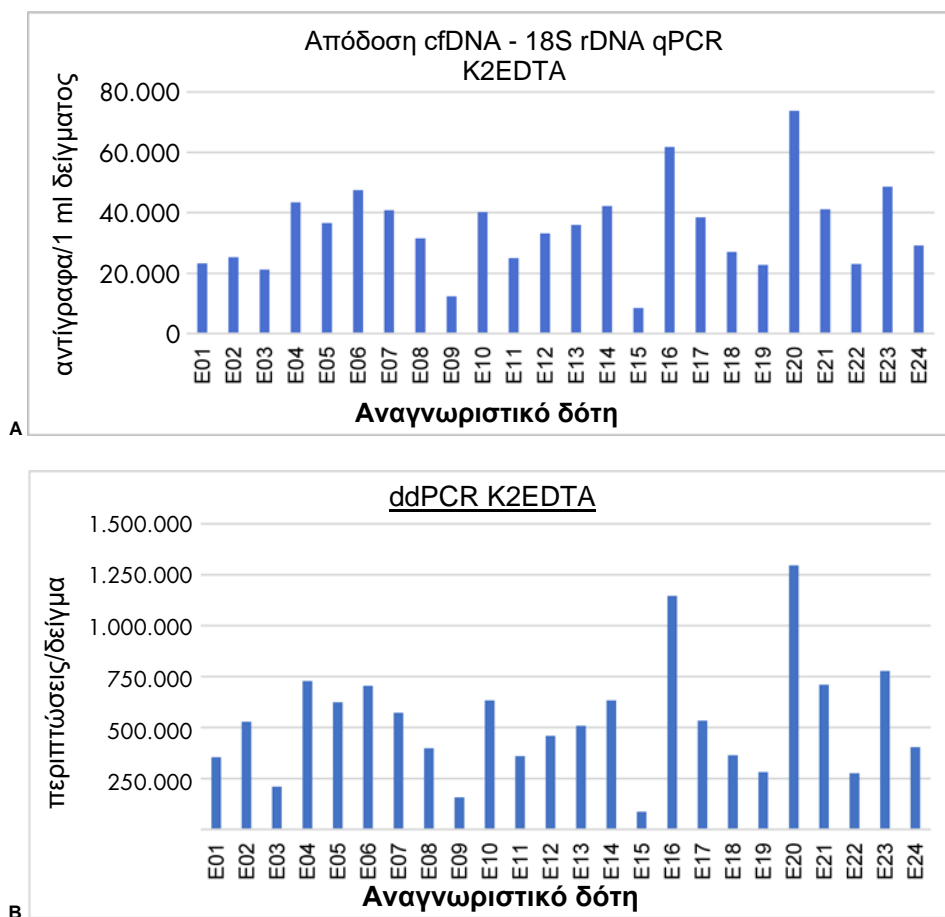
Απόδοση κεκαθαρμένων νουκλεϊκών οξέων (NO)

Τα δείγματα πλάσματος ενδέχεται να παρουσιάζουν υψηλή διακύμανση όσον αφορά την απόδοση κεκαθαρμένων νουκλεϊκών οξέων. Συνεπώς, οι χρήστες θα πρέπει να βελτιστοποιούν τον όγκο εισαγωγής πλάσματος και τον όγκο έκλουσης του ειδικού στόχου τους, καθώς και τις καθοδικές (downstream) εφαρμογές στο εργαστήριό τους.

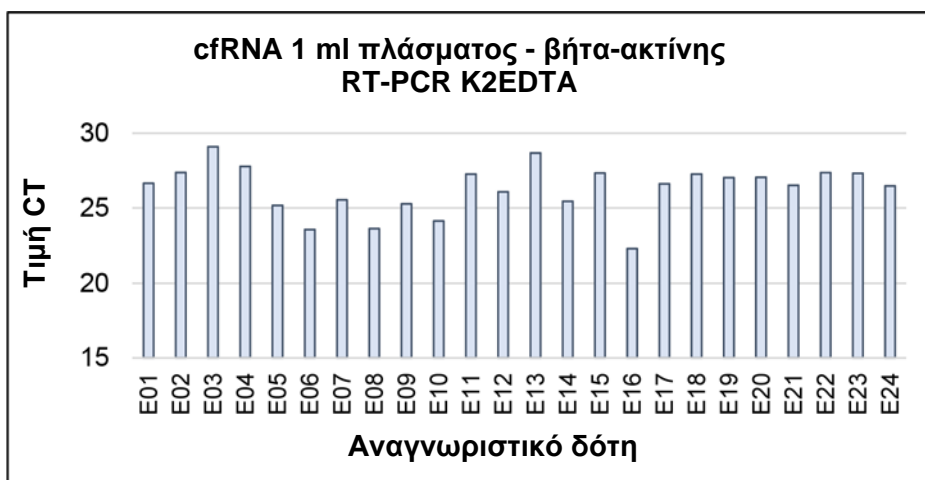
Εάν το kit χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με καθοδική (downstream) εφαρμογή QIAGEN®, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο για οδηγίες.

Ανάλυση καθοδικών (downstream) εφαρμογών

Τα νουκλεϊκά οξέα που απομονώνονται με το QIAamp DSP Circulating NA Kit είναι έτοιμα για χρήση σε διάφορες καθοδικές (downstream) εφαρμογές. Για την αξιολόγηση των επιδόσεων, νουκλεϊκά οξέα από ανθρώπινο πλάσμα αίματος ενός μόνο δότη απομονώθηκαν με τη χρήση τριών διαφορετικών σωληναρίων συλλογής αίματος (BD Vacutainer® K2EDTA Tube, Becton Dickinson®, PAXgene® Blood ccfDNA Tube, PreAnalytiX και Streck® Cell-Free DNA Blood Collection Tube (BCT)®, Streck, n = 24 δότες στο καθένα). Τα εκλούσματα από όγκο εισαγωγής πλάσματος 1 ml υποβλήθηκαν σε δοκιμασία με τη χρήση ποσοτικής PCR (quantitative PCR, qPCR, Εικόνα 1Α), ψηφιακής PCR τεχνολογίας σταγονιδίων (digital droplet PCR, ddPCR, Εικόνα 1Β), καθώς και qPCR αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription qPCR, RT-qPCR) για RNA (μόνο πλάσμα του BD Vacutainer K2EDTA Tube, Εικόνα 2).



Εικόνα 1. Σύγκριση πλάσματος ενός μόνο δότη (όγκος εισαγωγής 1 ml) μεταξύ qPCR και ddPCR (Bio-Rad®)



Εικόνα 2. Ανίχνευση RNA ελεύθερου κυττάρων σε πλάσμα ενός μόνο δότη (όγκος εισαγωγής 1 ml) με τη χρήση προσδιορισμού qPCR αντίστροφης μεταγραφής για το ανθρώπινο γονίδιο της β-ακτίνης (μήκος τμήματος 293 bp).

Για την ανάλυση αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS), δημιουργήθηκαν εκλούσματα από όγκο εισαγωγής πλάσματος 5 ml (BD Vacutainer K2EDTA Tube, PAXgene Blood ccfDNA Tube και Streck Cell-Free DNA BCT, n = 8 δότες στο καθένα). Η απόδοση ολικού DNA για πλάσμα 5 ml κυμάνθηκε μεταξύ 50 ng–150 ng DNA που ανιχνεύτηκαν με τον προσδιορισμό Qubit® HS dsDNA. Η ανάλυση NGS πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του GeneRead® QIAact Actionable Insights Tumor Panel και του συστήματος GeneReader™. Όλα τα δείγματα εμπλουτίστηκαν με επιτυχία και δημιουργήθηκαν βιβλιοθήκες. Ποσοστό μεγαλύτερο του 98% των ενδείξεων που δημιουργήθηκαν αντιστοιχίστηκε στο ανθρώπινο γονιδίωμα και ποσοστό μεγαλύτερο του 99,8% των θέσεων στις περιοχές ενδιαφέροντος είχε κάλυψη βάσης $\geq 500\times$.

Για αμφότερα τα είδη νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA), καταδείχθηκε επιτυχής εφαρμογή καθοδικών (downstream) τεχνολογιών (Εικόνα 3)

	qPCR	ddPCR	RT-qPCR	NGS
K2EDTA	✓	✓	✓	✓
PAXgene	✓	✓	δεν υποβλήθηκε σε δοκιμασία	✓
Streck	✓	✓	δεν υποβλήθηκε σε δοκιμασία	✓

Εικόνα 3. Επιτυχής χρήση απομονωμένων νουκλεϊκών οξέων με διαφορετικές καθοδικές (downstream) εφαρμογές.

Ο χρήστης θα πρέπει να βελτιστοποιήσει τον όγκο εισαγωγής πλάσματος και τον όγκο έκλουσης για το μόριο-στόχο, καθώς και οποιεσδήποτε μεταγενέστερες διαδικασίες που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριό του ή να ανατρέξει στις ειδικές επιδόσεις της σχετικής καθοδικής (downstream) εφαρμογής.

Σταθερότητα εκλουσμάτων

Η σταθερότητα των εκλουσμάτων θα εξαρτηθεί από το περιεχόμενο και τον τύπο των απομονωμένων νουκλεϊκών οξέων, τον όγκο έκλουσης και τις συνθήκες αποθήκευσης. Συνιστάται οι χρήστες να καθορίζουν τη σταθερότητα των εκλουσμάτων, όπως απαιτείται, με βάση τις ιδιαίτερες απαιτήσεις τους.

Η σταθερότητα των εκλουσμάτων ελέγχθηκε για DNA και εκλούσματα που προέρχονταν από ανθρώπινο πλάσμα το οποίο δημιουργήθηκε από BD Vacutainer K2EDTA Tube (Becton Dickinson) και σωληνάρια συλλογής αίματος για σταθεροποίηση (PAXgene Blood ccfDNA Tube και Streck Cell-Free DNA BCT). Τα εκλούσματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασίες -30 έως -15 °C και -90 έως -65 °C. Δεν παρατηρήθηκε υποβάθμιση για έως και 12 μήνες. Τα εκλούσματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 2-8 °C και σε θερμοκρασία δωματίου (15-25 °C) διατήρησαν τη σταθερότητά τους για έως και 48 ώρες. Όλες οι συνθήκες αξιολογήθηκαν με τη χρήση qPCR η οποία στόχευε το ανθρώπινο γονίδιο 18S rDNA.

Η σταθερότητα του εκλούσματος ελέγχθηκε για RNA και εκλούσματα που προέρχονταν από ανθρώπινο πλάσμα το οποίο δημιουργήθηκε από σωληνάρια BD Vacutainer K2EDTA Tube (Becton Dickinson). Τα εκλούσματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασίες -30 έως -15 °C και -90 έως -65 °C. Δεν παρατηρήθηκε υποβάθμιση για έως και 6 μήνες. Τα εκλούσματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 2-8 °C διατήρησαν τη σταθερότητά τους για έως και 48 ώρες. Όλες οι συνθήκες αξιολογήθηκαν με τη χρήση RT-qPCR η οποία στόχευε το ανθρώπινο γονίδιο της β-ακτίνης.

Εάν το kit χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με καθοδικές (downstream) εφαρμογές QIAGEN, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο kit για οδηγίες.

Ακρίβεια της απομόνωσης NO

Η ακρίβεια αξιολογήθηκε με τη χρήση ανθρώπινου πλάσματος, ενώ οι συνθήκες αξιολογήθηκαν με τη χρήση qPCR που στόχευε το ανθρώπινο γονίδιο 18S rDNA.

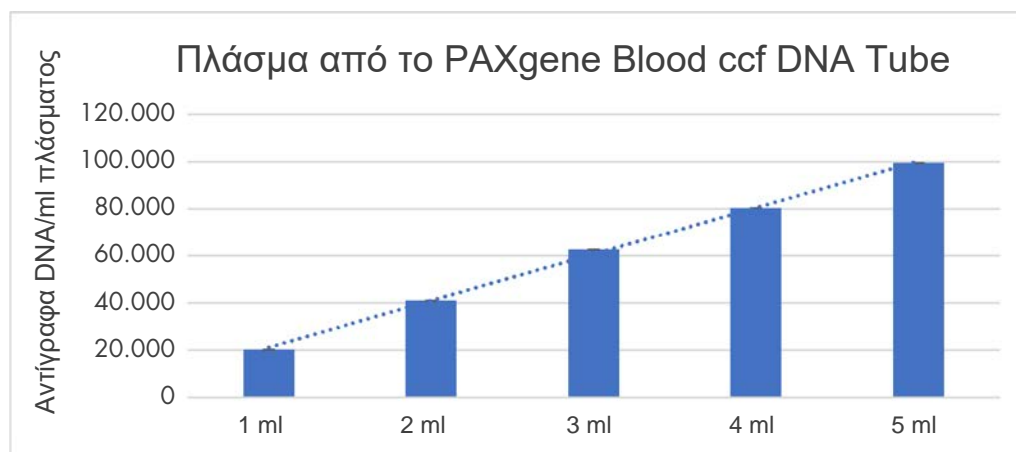
Η προετοιμασία πειράματος περιελάμβανε 12 εκτελέσεις καθαρισμού με 12 επαναλήψεις η καθεμία (συνολικά 144 καθαρισμοί). Οι εκτελέσεις καθαρισμού πραγματοποιήθηκαν από τρεις διαφορετικούς χειριστές, σε τρεις διαφορετικές ημέρες, με τρία διαφορετικά όργανα, με τη χρήση τριών διαφορετικών παρτίδων του QIAamp DSP Circulating NA Kit. Η τυπική απόκλιση (Standard Deviation, SD) και ο συντελεστής διακύμανσης (Coefficient of Variation, CV) προσδιορίστηκαν για κάθε μεμονωμένη παράμετρο και για τη συνολική μεταβλητότητα (σύνολο) του QIAamp DSP Circulating NA Kit (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Αποτελέσματα ακρίβειας

Ακρίβεια			
Παράμετρος	Μέσα αντίγραφα/ml	SD	CV (%)
Από εκτέλεση σε εκτέλεση	25894	461	1,78
Από χειριστή σε χειριστή		1392	5,38
Από όργανο σε όργανο		228	0,88
Από ημέρα σε ημέρα		2096	8,09
Από παρτίδα σε παρτίδα		969	3,74
Σύνολο		3120	12,05

Γραμμικότητα

Έχουν δημιουργηθεί δεδομένα για όγκο εισαγωγής πλάσματος 1–5 ml που αποθηκεύτηκε σε σωληνάρια BD Vacutainer K2EDTA Tube, PAXgene Blood ccfDNA Tube και Streck Cell-Free DNA BCT. Για όλα τα BCT, παρατηρήθηκε γραμμική αύξηση της απόδοσης DNA (βλ. Εικόνα 4). Για τα σωληνάρια BD Vacutainer K2EDTA Tube, παρατηρήθηκε επίσης το ίδιο για το RNA.



Εικόνα 4. Γραμμική αύξηση της απόδοσης ολικού DNA (αντίγραφα DNA/ml εισαγωγής πλάσματος) για διαφορετικούς όγκους εισαγωγής πλάσματος. Απεικόνιση δεδομένων για το πλάσμα που δημιουργήθηκε από PAXgene Blood ccfDNA Tube, ισοδύναμα αποτελέσματα για το πλάσμα που προερχόταν από BD Vacutainer K2EDTA Tube (DNA/RNA) και Streck Cell-Free DNA BCT.

Ισοδυναμία πρωτοκόλλων (πρωτόκολλο Breeze/κλασικό πρωτόκολλο)

Η ισοδυναμία στις επιδόσεις μεταξύ του πρωτοκόλλου Breeze και του κλασικού πρωτοκόλλου προσδιορίστηκε αφού καταδείχθηκε ότι το αντίστοιχο όριο εμπιστοσύνης 95% της διαφοράς στη μέση τιμή Ct (RNA) ή στα μέσα αντίγραφα/ml (DNA) βρισκόταν εντός του $\pm 2 \times \text{SD}$, με την SD να είναι η παρατηρούμενη ακρίβεια του κλασικού πρωτοκόλλου (συνθήκη αναφοράς). Χρησιμοποιήθηκαν τρεις παρτίδες kit και τρεις χειριστές εκτέλεσαν τα πειράματα.

Η συνολική ακρίβεια (SD) των τιμών Ct που δημιουργήθηκαν για το πρωτόκολλο Breeze ήταν μικρότερη από το άνω άκρο του αμφίπλευρου διαστήματος πρόβλεψης 95% για τη συνολική ακρίβεια (SD) του κλασικού πρωτοκόλλου, όπου το διάστημα πρόβλεψης υπολογίστηκε στο πλαίσιο της μελέτης με τη χρήση των δεδομένων από το κλασικό πρωτόκολλο (n = 143) και με τη χρήση του αριθμού σημείων δεδομένων για το πρωτόκολλο Breeze (n = 144) στη μελέτη.

Παρεμβαλλόμενες ουσίες

Δυνητικώς παρεμβαλλόμενες ουσίες μπορούν να προέρχονται από διάφορες πηγές, π.χ., φυσικούς μεταβολίτες, ουσίες που εισάγονται κατά τη διάρκεια της θεραπείας του ασθενούς ή ουσίες που προσλαμβάνει ο ασθενής. Για το QIAamp DSP Circulating NA Kit, η αιμοσφαιρίνη, τα τριγλυκερίδια, το EDTA, η καφεΐνη, η λευκωματίνη, η συζευγμένη χολερυθρίνη και η μη συζευγμένη χολερυθρίνη υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ως ενδογενή συστατικά. Δεν διαπιστώθηκε παρεμβολή κατά τη διενέργεια qPCR ως καθοδικής (downstream) εφαρμογής. Επιπλέον, καμία παρεμβολή δεν προήλθε από συστατικά του QIAamp DSP Circulating NA Kit (πρωτεΐνωση K, Buffer ACL, Buffer ACB, Buffer ACW1, Buffer ACW2 και αιθανόλη) κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του δείγματος, ενώ παρατηρήθηκε εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων.

Λόγω του σύνθετου χαρακτήρα των δυνητικώς παρεμβαλλόμενων ουσιών και της διαφορετικής ευαισθησίας της εκάστοτε καθοδικής (downstream) εφαρμογής, συνιστούμε οι χρήστες να αξιολογούν την επίδραση παρεμβαλλόμενων ουσιών ειδικά για τη ροή εργασιών τους και να επικυρώνουν μια μέθοδο για τον έλεγχο των παρεμβολών στη διαγνωστική καθοδική (downstream) εφαρμογή που χρησιμοποιούν.

Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με παρεμβαλλόμενες ουσίες σε συγκεκριμένες καθοδικές (downstream) εφαρμογές QIAGEN®, ανατρέξτε στα σχετικά εγχειρίδια kit.

Διασταυρούμενη επιμόλυνση

Για την αξιολόγηση του επιπέδου διασταυρούμενης επιμόλυνσης, 5 ml ή 2 ml ανθρώπινου πλάσματος αίματος εμβολιάστηκαν με 10^5 αντίγραφα ιού HBV (θετικά δείγματα) και απομονώθηκαν δίπλα σε δείγματα που δεν περιείχαν ιό (αρνητικά δείγματα) σε ρύθμιση τύπου σκακιέρας όπου πραγματοποιούνταν εναλλαγή με εκτελέσεις εκχύλισης που περιείχαν μόνο αρνητικά δείγματα (για την αξιολόγηση της διασταυρούμενης επιμόλυνσης εντός και μεταξύ των εκτελέσεων εκχύλισης). Στόχος της μελέτης ήταν η μίμηση της κατάστασης κατά την οποία τα δείγματα που περιέχουν υψηλό επίπεδο μορίων-στόχων ενός νουκλεϊκού οξέος μπορούν να προκαλέσουν διασταυρούμενη επιμόλυνση σε άλλα δείγματα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκχύλισης. Ο καθαρισμός των NO πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μίας παρτίδας αντιδραστηρίων. Η διασταυρούμενη επιμόλυνση αξιολογήθηκε με τη χρήση του *artus*® HBV RG CE PCR Kit. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν μηδενική διασταυρούμενη επιμόλυνση σε ολόκληρο το σύστημα.

Σημειώσεις

Ιστορικό αναθεώρησης

Ημερομηνία	Αλλαγές
R1 09/2019	Αρχική κυκλοφορία
R2 08/2021	<p>Αναθεωρημένες συνθήκες αποθήκευσης για σταθερότητα εκλουσμάτων που ελέγχθηκε για DNA:</p> <p>Η αποθήκευση σε θερμοκρασία -30 έως -15 °C και -90 έως -65 °C είναι δυνατή για έως και 12 μήνες.</p> <p>Αναθεωρημένες συνθήκες αποθήκευσης για σταθερότητα εκλουσμάτων που ελέγχθηκε για RNA:</p> <p>Η αποθήκευση σε θερμοκρασία -30 έως -15 °C και -90 έως -65 °C είναι δυνατή για έως και 6 μήνες.</p> <p>Διόρθωση σφάλματος στο φύλλο απόδοσης: Η αποθήκευση RNA δεν έχει ελεγχθεί σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C).</p> <p>Διόρθωση των δεδομένων της μελέτης ακρίβειας στις στήλες SD και CV στον Πίνακα 1.</p>

Για ενημερωμένες πληροφορίες άδειας χρήσης και για δηλώσεις αποποίησης ευθύνης σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο αντίστοιχο εγχειρίδιο κιτ QIAGEN ή εγχειρίδιο χρήστη. Τα εγχειρίδια των κιτ QIAGEN και τα εγχειρίδια χρήστη είναι διαθέσιμα στη διεύθυνση **www.qiagen.com** ή μπορείτε να τα ζητήσετε από το τμήμα Τεχνικών Υπηρεσιών της QIAGEN ή τον διανομέα της περιοχής σας.

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, artus®, GeneRead®, GeneReader™ (Όμιλος QIAGEN), 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 ή οι θυγατρικές της).

HB-0466-D01-002 © 2021 QIAGEN, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

