




# Sooritusnäitajad

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

Versiooni haldus

  	Enne analüüsi alustamist kontrollige elektroonilise tähistuse uute redaktsioonide kättesaadavust veebisaidil <b>www.qiagen.com</b> tootenumbri ja tooteressursside abil.
---	--

## Sissejuhatus

QIAamp DSP Circulating NA Kit on süsteem, mis kasutab inimvere plasmaproovidest tsirkuleeriva rakuvaba (circulating cell-free, ccf) DNA ja RNA eraldamiseks ja puhastamiseks kvarts-membraantehnoloogiat (QIAamp tehnoloogia).

Toode on ette nähtud kasutamiseks kutseala esindajatele, nagu nt tehnikutele ja arstidele, kes on saanud väljaõppe molekulaarbioloogia meetodite kasutamiseks.

Komplekt QIAamp DSP Circulating NA Kit on ette nähtud kasutamiseks *in vitro* diagnostikas.

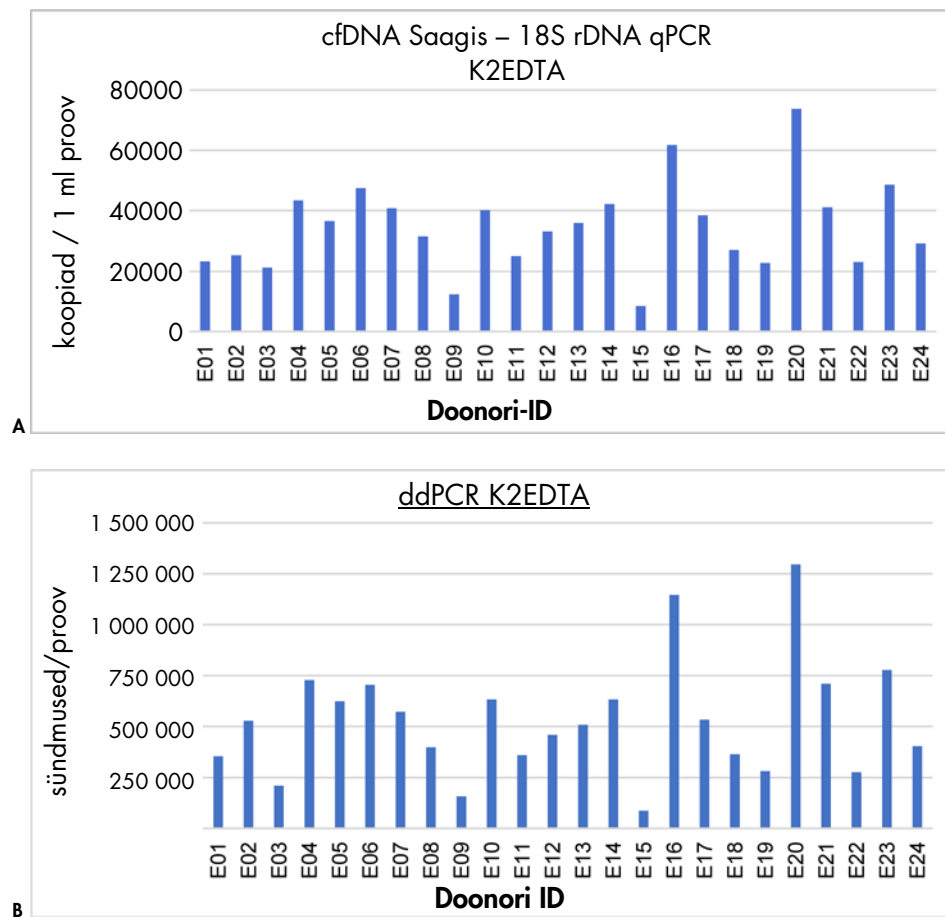
## Puhastatud nukleiinhapete saagised (Nucleic Acids, NA)

Plasmaproovides võib esineda puhastatud nukleiinhapete saagise suurt varieeruvust. Seetõttu peaksid kasutajad optimeerima plasma sisendi ja elueerimise mahu vastavalt labori konkreetsetele siht- ja järelrakendustele.

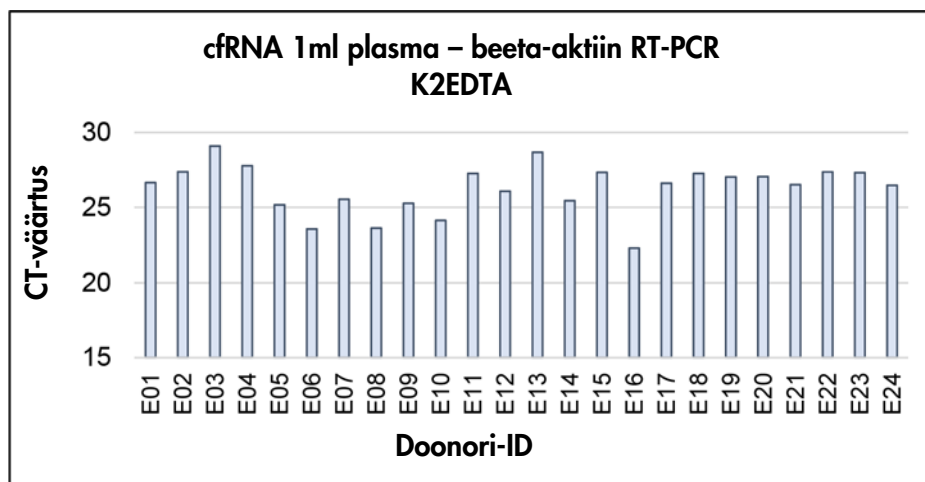
Kui komplekti kasutatakse koos ettevõtte QIAGEN® järelrakendusega, vaadake juhiseid vastavast käsiraamatust.

## Järelrakenduste analüüs

Komplektiga QIAamp DSP Circulating NA Kit eraldatud nukleiinhappeid saab kasutada erinevates järelrakendustes. Näitajate hindamiseks eraldati ühe doonori inimvereplasmast nukleiinhapped kolme erineva verevõtukatsutiga (BD Vacutainer® K2EDTA Tube, Becton Dickinson®; PAXgene® Blood ccfDNA Tube, PreAnalytiX; ja Streck® Cell-Free DNA Blood Collection Tube (BCT)®, Streck; n = 24 doonorit igaüks). 1 ml plasmasisendi eluaatides testiti RNA-d kvantitatiivse PCR-iga (quantitative PCR, qPCR, Joonis 1 A), digitaalse tilga PCR-iga (digital droplet PCR, ddPCR, Joonis 1 B), samuti pöördtranskriptsioon qPCR-iga (reverse transcription qPCR, RT-qPCR) (ainult katsuti BD Vacutainer K2EDTA Tube plasma, Joonis 2).



Joonis 1. Ühe doonori plasma (1 ml sisend) võrdlus qPCR-i ja ddPCR-i vahel (Bio-Rad®)



Joonis 2. Rakuvaba RNA tuvastamine ühe doonori plasmas (1 ml sisend), kasutades inimese beeta-aktiini geeni (293 bp fragmendi pikkus) pöördtranskriptsioon-qPCR analüüsi.

Järgmise põlvkonna sekveneerimise (Next Generation Sequencing, NGS) analüüsiks genereeriti eluaadid 5 ml plasma sisendmahust (BD Vacutainer K2EDTA Tube, PAXgene Blood ccfDNA Tube ja Streck Cell-Free DNA BCT; n = 8 doonorit igaüks). 5 ml plasma DNA kogusaagis oli vahemikus 50–150 ng tuvastatud DNA-d Qubit® HS dsDNA analüüsiga. NGS-i analüüs tehti GeneRead® QIAact Actionable Insights Tumor Paneli ja süsteemiga GeneReader™. Kõik proovid rikastati ja loodi teegid. > 98% genereeritud näitudest vastendati inimgenoomiga ja > 99,8% positsioonidest huvipakkuvates alades oli aluskatvus ≥ 500x.

Mõlema nukleiinhappeliigi (DNA ja RNA) korral toimus edukas järeltehnoloogiate rakendamine (Joonis 3)

	qPCR	ddPCR	RT-qPCR	NGS
K2EDTA	✓	✓	✓	✓
PAXgene	✓	✓	ei testitud	✓
Streck	✓	✓	ei testitud	✓

Joonis 3. Eraldatud nukleiinhapete kasutamine erinevate järelrakendustega.

Kasutajad peaksid optimeerima plasma sisendi ja elueerimise mahu vastavalt sihtmolekulile ja järgnevatele laboris tehtavatele protseduuridele või kontrollima kohase järelrakenduse konkreetseid näitajaid.

## Eluaadi stabiilsus

Eluaadi stabiilsus oleneb eraldatud nukleiinhapete sisust ja liigist, elueerimise mahust ja hoiutingimustest. Soovitame kasutajatel kehtestada oma spetsiifilistele nõuetele vastav eluaadi stabiilsus.

Testiti BD Vacutainer K2EDTA Tube (Becton Dickinson) katsutist ja stabiliseerivatest verevõtukatsutitest (PAXgene Blood ccfDNA Tube ja Streck Cell-Free DNA BCT) genereeritud inimplasmast saadud eluaatide stabiilsust. Eluaate hoiti temperatuuridel –30...–15 °C ja –90...–65 °C. Kuni 12 kuu jooksul ei täheldatud halvenemist. Temperatuuril 2–8 °C ja toatemperatuuril (15–25 °C) hoitud eluaadid olid stabiilsed kuni 48 tundi. Kõiki seisundeid hinnati inimese 18S rDNA geeni sihtiva qPCR-ga.

Testiti RNA ja BD Vacutainer K2EDTA Tubes (Becton Dickinson) katsutist genereeritud inimplasmast saadud eluaatide stabiilsust. Eluaate hoiti temperatuuridel –30...–15 °C ja –90...–65 °C. Kuni 6 kuu jooksul ei täheldatud halvenemist. Temperatuuril 2–8 °C hoitud eluaadid olid stabiilsed kuni 48 tundi. Kõiki seisundeid hinnati inimese beeta-aktiini geeni sihtiva RT-qPCR-ga.

Kui komplekti kasutatakse koos ettevõtte QIAGEN järelrakendustega, vaadake juhiseid vastavast käsiraamatust.

## NA-eralduse täpsus

Täpsust hinnati inimplasmaga ja seisundeid hinnati inimese 18S rDNA geeni sihtiva qPCR-iga.

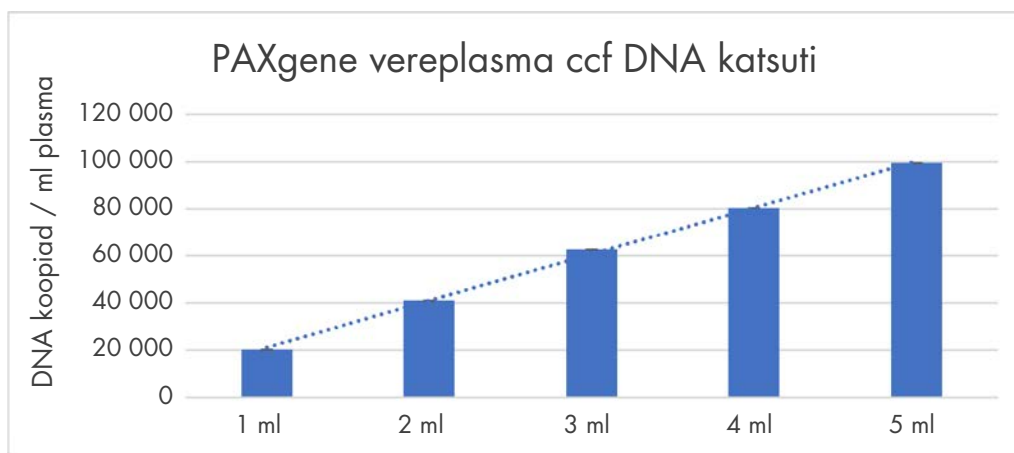
Katseseadistus hõlmas 12 puhastamiskäitust, igas 12 kordust (kokku 144 puhastamist). Puhastamiskäitused korraldasid kolm erinevat operaatorit kolmel erineval päeval kolme erineva seadmega ja komplekti QIAamp DSP Circulating NA Kit kolmes erinevas pesas. Iga üksiku parameetri ja komplekti QIAamp DSP Circulating NA Kit üldise varieeruvuse (kokku) kohta määrati standardhälve (Standard Deviation, SD) ja variatsioonikordaja (Coefficient of Variation, CV) (Tabel 1).

**Tabel 1. Täpsuse tulemused**

Täpsus			
Parameeter	Keskmsed koopiad / ml	SD	CV (%)
Käituste kaupa	25894	461	1,78
Operaatorite kaupa		1392	5,38
Seadmete kaupa		228	0,88
Päevade kaupa		2096	8,09
Partiide kaupa		969	3,74
Kokku		3120	12,05

## Lineaarsus

Genereeriti BD Vacutainer K2EDTA Tube katsutites, PAXgene Blood ccfDNA Tube katsutites ja Streck Cell-Free DNA BCT-des talletatud vere 1–5 ml plasma sisendmahu andmed. Kõigis BCT-des täheldati DNA saagise lineaarset tõusu (vt Joonis 4); BD Vacutainer K2EDTA Tube katsutites täheldati sama ka RNA kohta.



**Joonis 4.** DNA kogusaagise (DNA koopiad / ml plasma sisend) lineaarne tõus erinevate plasma sisendmahtude korral. Näidatud PAXgene Blood ccfDNA Tube katsuti plasma genereeritud andmed, ekvivalentsed tulemused BD Vacutainer K2EDTA Tube katsutist (DNA/RNA) ja Streck Cell-Free DNA BCT-st tuletatud plasmaga.

## Protokolli ekvivalentsus (Breeze-/klassikalised protokollid)

Breeze-protokolli ja klassikalise protokolli näitajate ekvivalentsuse määramiseks näidati, et keskmise Ct-väärtuse (RNA) või keskmise koopiate/ml (DNA) vastav erinevuse 95% konfidentsuslimiit oli  $\pm 2 \times SD$  piires, milles SD oli klassikalise protokolli täheldatav täpsus (referentskonditsioon). Kasutati kolme komplekti partiid ja katsed viisid läbi kolm operaatorit.

Breeze-protokolli genereeritud Ct väärtuste kogutäpsus (SD) oli allpool kogutäpsuse kahepoolse 95% ennustusintervalli ülempiiri klassikalises protokollis, kus ennustusintervall arvutati uuringu piires, kasutades klassikalise protokolli andmeid ( $n = 143$ ) ja uuringu Breeze-protokolli andmepunktide arvu ( $n = 144$ ).

## Segavad ained

Potentsiaalselt segavad ained võivad pärineda erinevatest allikatest, nt looduslikest metaboliitidest, patsiendi ravi käigus sisestatud ainetest või patsiendi poolt alla neelatud ainetest. Komplekti QIAamp DSP Circulating NA Kit jaoks testiti endogeensete komponentidena hemoglobiini, triglütseriide, EDTA-d, kofeiini, albumiini, konjugeeritud bilirubiini ja konjugeerimata bilirubiini. qPCR-i rakendamisel järelrakendusena segamist ei täheldatud. Samuti ei täheldatud proovi töötlemise ja nukleiinhapete eraldamise ajal komplekti QIAamp DSP Circulating NA Kit (Proteinase K, Buffer ACL, Buffer ACB, Buffer ACW1, Buffer ACW2 ja etanool) komponentidest tulenevat segamist.

Potentsiaalselt segavate ainete keerukuse ja konkreetsete järelrakenduste erineva tundlikkuse tõttu soovitame kasutajatel hinnata oma konkreetse töövoospetsiifiliste segavate ainete mõju ja kehtestada oma konkreetse diagnostilise järelrakenduse segamise kontrollimise meetod.

---

Lisateavet segavate ainete kohta konkreetsetes ettevõtte QIAGEN® järelrakendustes vaadake komplekti käsiraamatutest.

## Ristsaastumine

Ristsaastumise taseme hindamiseks lisati  $10^5$  HBV-viiruse koopiat 5 ml või 2 ml inimvere plasmasse (positiivsed proovid) ja eraldati viirusevabade proovide (negatiivsed proovid) kõrval malelauapaigutuses vaheldumisi ekstraheerimiskäitustega, mis sisaldasid ainult negatiivseid proove (intra- ja inter-ekstraheerimiskäituse ristsaastumise hindamiseks). Uuringu eesmärgiks oli imiteerida olukorda, kus kõrge nukleiinhappe sihtmolekulide tasemega proovid võivad ekstraheerimisprotseduuri ajal ristsaastuda muude proovidega. NA puhastamine viidi läbi ühe reaktiivipartiiga. Ristsaastumist hinnati komplektiga *artus*® HBV RG CE PCR Kit. Tulemused ei näidanud kogu süsteemi ulatuses mingit ristsaastumist.

---

## Märkused

## Redaktsiooni ajalugu

Kuupäev	Muudatused
R1 09/2019	Esmane väljalase
R2 08/2021	DNA jaoks testitud eluaadi stabiilsuse muudetud säilitamistingimused: säilitamine –30...–15 °C ja –90...–65 °C juures on võimalik kuni 12 kuud. RNA jaoks testitud eluaadi stabiilsuse muudetud säilitamistingimused: säilitamine –30...–15 °C ja –90...–65 °C juures on võimalik kuni 6 kuud. Parandatud viga toimivuslehel: RNA säilitamist pole toatemperatuuril (15–25°C) kontrollitud. Korrigeeritud täpsusuringu andmed tabeli 1 veergudes SD ja CV.

Ajakohase litsentsiteabe ja tootepõhised lahtiütlemised leiate vastavast QIAGEN-i komplekti käsiraamatust või kasutusjuhendist. QIAGEN-i komplekti käsiraamatud ja kasutusjuhendid on saadaval veebilehel **www.qiagen.com** või tellimisel QIAGEN-i tehniliselt toelt või kohalikult müügiesindajalt.

Kaubamärgid: 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 või selle tütarettevõtte).  
HB-0466-D01-002 © 2021 QIAGEN. Kõik õigused kaitstud.



